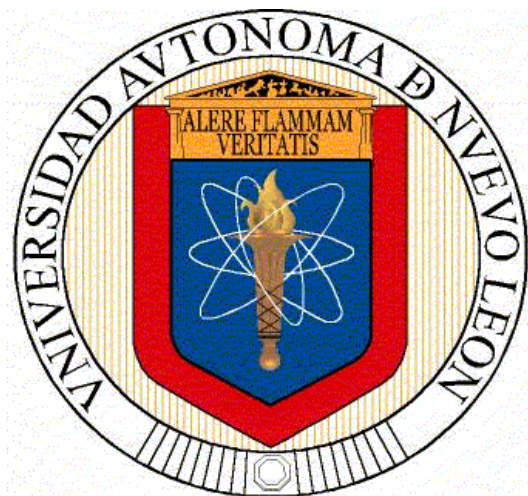


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DEL COMPLEJO
*Pseudallescheria boydii***

**POR
M.C. MARIANA ELIZONDO ZERTUCHE**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL EN
MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

DICIEMBRE

2014

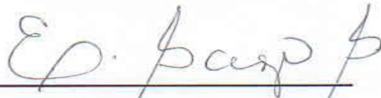
**"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS
CLÍNICOS Y AMBIENTALES DEL COMPLEJO *Pseudallescheria boydii*"**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. Gloria Ma. González González

Director de Tesis



Dr. C. Elvira Garza González

Co-director de Tesis



Dr. C. Adrian G. Rosas Taraco

Miembro de la Comisión



Dr. C. Lydia G. Rivera Morales

Miembro de la Comisión



Dr. C. Jorge E. Castro Garza

Miembro de la Comisión



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DEL COMPLEJO
*Pseudallescheria boydii***

Presentado por:

M.C. MARIANA ELIZONDO ZERTUCHE

Este trabajo se realizó en el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dr. C. Gloria Ma. González González, y la co-dirección de la Dr. C. Elvira Garza González.

Dr. C. Gloria Ma. González González

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y su amor infinito.

A la Dra. Gloria por su invaluable apoyo y cariño.

A ti Efrén por tú soporte y aliento en esta aventura.

GRACIAS,

Dr. C. Gloria Ma. González Gzz., por esta oportunidad, aliento, consejos y todo lo que conlleva haber realizado otra etapa más en mi vida profesional.

A todo el personal del Departamento de Microbiología por su disposición y ayuda en especial a la Q.C.B. Lydia Oviedo, y al personal técnico Angelitos muchas gracias.

Mi especial agradecimiento a la M.C.P. Ana Laura Sánchez por su gran apoyo en la realización de esta tesis, así como el invaluable soporte de la Dr. C. Margarita Martínez Fierro y la Dr. C. Idalia Garza Veloz por su participación en este trabajo y al Q.B.P. Iram Rodríguez Sánchez por su aporte en el análisis molecular de este proyecto, mil gracias a todos.

A mis amigos por su aliento en los momentos de fracaso, por su comprensión, consejos, apoyo y sus frecuentes muestras de lealtad y cariño.

El conocimiento

Nuestros corazones saben, en silencio, los secretos de los días y las noches. Pero nuestros oídos padecen por el sonido del conocimiento de nuestro corazón. Querrás saber, en palabras, lo que siempre supiste en el pensamiento: querrás tocar con tus manos el cuerpo desnudo de tus sueños. Y es bueno que lo hagas. El manantial escondido de tu alma necesita brotar y correr murmurando hacia el mar; y el tesoro de nuestros infinitos arcanos sería revelado a tus ojos. Pero no pongas balanzas para pesar tu tesoro escondido. Y no registres los arcanos de tu conocimiento con palos ni sonadas. Porque el yo es un mar inconmensurable.

No digas “He hallado la verdad”, sino más bien “He hallado una verdad”.

No digas “He encontrado el alma caminando en mi senda”, porque el alma camina sobre todas las sendas”.

El alma no camina en línea recta, ni crece como un bambú. El alma se despliega como un loto de innumerables pétalos.

Khalil Gibrán

ÍNDICE

| CAPÍTULO | Página |
|---|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Generalidades sobre del género <i>Scedosporium</i> | 1 |
| 1.2 Historia | 2 |
| 1.3 Biología y ecología | 5 |
| 1.4 Características fenotípicas | 8 |
| 1.5 Análisis molecular aplicado a la taxonomía de los hongos | 14 |
| 1.5.1 Identificación molecular del complejo <i>Scedosporium</i> <i>apiospermum</i> | 16 |
| 1.5.2 Filogenia molecular | 18 |
| 1.5.2.1 Inferencia filogenética | 19 |
| 1.5.2.2 Genes empleados en la filogenia de los hongos | 23 |
| 1.5.2.2.1 ADN ribosómico | 23 |
| 1.5.2.2.2 Otros genes utilizados en la filogenia de los hongos | 24 |

| | |
|---|----|
| 1.6 Infecciones causadas por el complejo <i>Scedosporium</i> | |
| <i>apiospermum</i> | 26 |
| 1.7 Estudios de sensibilidad antifúngica | 29 |
| 1.7.1 Susceptibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos | 30 |
| 1.7.2 Sensibilidad <i>in vitro</i> del complejo <i>Scedosporium</i> a los | |
| antifúngicos | 31 |
| 1.7.3 Tratamiento de las infecciones por el complejo de | |
| <i>Scedosporium</i> | 34 |
| 1.8 Estudios <i>in vivo</i> en modelos animales de scedosporiosis | |
| sistémica | 35 |
| 1.9 Objetivos | 38 |
| 1.9.1. Objetivo general | 38 |
| 1.9.2 Objetivos específicos | 38 |
| JUSTIFICACIÓN | 39 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 40 |
| 2.1 Estrategia general | 40 |

| | |
|---|----|
| 2.2 Cepas clínicas | 42 |
| 2.3 Cepas ambientales..... | 42 |
| 2.3.1 Activación de suelos, aislamiento y obtención de cultivos puros..... | 43 |
| 2.4 Determinación de pH y nitrógeno total de muestras de suelo..... | 44 |
| 2.5 Identificación molecular..... | 45 |
| 2.5.1 Extracción de ADN | 45 |
| 2.5.2 Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ADNr..... | 46 |
| 2.5.3 Purificación de los productos amplificados..... | 47 |
| 2.5.4 Secuenciación de los productos de la PCR..... | 47 |
| 2.5.5 Alineamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas..... | 48 |
| 2.5.6 Deposito de las secuencias en el GenBank..... | 48 |
| 2.6 Estudios fenotípicos..... | 49 |
| 2.6.1 Características morfológicas..... | 49 |
| 2.6.1.1 Macroscópicas..... | 49 |
| 2.6.1.2 Microscópicas..... | 50 |
| 2.7 Estudios fisiológicos y enzimáticos | 50 |

| | |
|---|----|
| 2.7.1 Pruebas de asimilación de carbohidratos..... | 50 |
| 2.7.2 Pruebas de actividad enzimática | 51 |
| 2.8 Estudios de susceptibilidad <i>in vitro</i> a los antifúngicos | 52 |
| 2.8.1 Método de microdilución..... | 52 |
| 2.8.2 Agentes antifúngicos..... | 52 |
| 2.8.3 Preparación del inóculo..... | 53 |
| 2.8.4 Condiciones del micrométodo e interpretación de resultados..... | 54 |
| 2.8.5 Análisis estadístico..... | 54 |
| 2.9 Estudio de carga fúngica y análisis histopatológico en un modelo murino de scedosporiosis sistémica..... | 55 |
| 2.9.1 Preparación del inóculo..... | 55 |
| 2.9.2 Estudio de carga fúngica e histopatología para especies del complejo <i>Scedosporium</i> | 56 |
| 2.9.3 Estudios de supervivencia, carga fúngica e histopatología para <i>L. prolificans</i> | 57 |
| 2.9.3.1 Estudio de supervivencia..... | 57 |

| | |
|--|----|
| 2.9.3.2 Estudio de carga fúngica e histopatología..... | 57 |
| 2.9.4 Correlación de los datos epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y moleculares..... | 58 |
| 3. RESULTADOS | 59 |
| 3.1 Aislamientos..... | 59 |
| 3.2 Determinación de nitrógeno total y pH..... | 61 |
| 3.3 Identificación molecular..... | 63 |
| 3.3.1 Análisis filogenético..... | 68 |
| 3.4 Características fenotípicas..... | 75 |
| 3.4.1 Características macroscópicas y microscópicas..... | 75 |
| 3.4.2 Características fisiológicas..... | 81 |
| 3.4.2.1 Termotolerancia..... | 81 |
| 3.4.2.2 Asimilación de carbohidratos..... | 83 |
| 3.4.2.3 Actividad enzimática..... | 86 |
| 3.4.2.4 Susceptibilidad <i>in vitro</i> | 90 |
| 3.5 Modelo murino de scedosporiosis sistémica..... | 94 |

| | |
|--|-----|
| 3.5.1 Carga fúngica para especies del complejo <i>Scedosporium</i> | 94 |
| 3.5.2 Estudio de supervivencia y carga microbiana de cepas de <i>L. prolificans</i> | 104 |
| 3.6 Correlación de la identificación molecular, con los datos del sitio de aislamiento, zona geográfica, pH del suelo y actividad proteasa y fosfolipasa entre los aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 110 |
| 4. DISCUSIÓN | 118 |
| 5. CONCLUSIÓN | 124 |
| PERSPECTIVAS | 126 |
| REFERENCIAS | 127 |
| ANEXOS | 142 |

| | |
|-----------------|-----|
| APENDÍCE A..... | 142 |
| APENDICE B..... | 144 |

ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA..... | Página |
|--|--------|
| 1. Características morfológicas más relevantes de las especies de <i>Pseudallescheria</i> | 3 |
| 2. Espectro clínico de la scedosporiosis..... | 27 |
| 3. 101 muestras ambientales recolectadas de 26 estados de México | 43 |
| 4. Iniciadores utilizados para la PCR y secuenciación..... | 46 |
| 5. Antifúngicos utilizados, rango de concentraciones utilizadas y compañías farmacéuticas..... | 53 |
| 6. Muestras procesadas y aislamientos..... | 60 |
| 7. Nitrógeno total y pH de las muestras de suelo positivas..... | 62 |
| 8. Aislamientos clínicos: número de referencia del laboratorio, número acceso GenBank, especie, origen geográfico y diagnóstico presuntivo..... | 65 |
| 9. Aislamientos ambientales: número de referencia del laboratorio, número acceso GenBank, especie, origen del sitio y geográfico..... | 66 |

| | |
|--|----|
| 10. Termotolerancia a diferentes temperaturas y diámetro de las colonias desarrolladas | 82 |
| 11. Patrones de asimilación de carbohidratos de los aislamientos ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> | 84 |
| 12. Patrones de asimilación de carbohidratos de los aislamientos clínicos del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 85 |
| 13. Patrones de actividad enzimática de los aislamientos ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> | 88 |
| 14. Patrones de actividad enzimática de los aislamientos clínicos del Complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 89 |
| 15. Susceptibilidad <i>in vitro</i> de 109 aislamientos ambientales y clínicos del complejo <i>Scedosporium</i> | 92 |
| 16. Resultados de susceptibilidad <i>in vitro</i> de los aislamientos clínicos de <i>L. prolificans</i> | 94 |
| 17. Carga fúngica del modelo murino de Scedosporiosis sistémica con diferentes especies del complejo <i>Scedosporium</i> | 96 |

| | |
|--|-----|
| 18. Media del tiempo de sobrevivencia (MTS) de ratones infectados con diferentes cepas de <i>L. prolificans</i> | 106 |
| 19. Carga fúngica del modelo murino de infección sistémica con diferentes especies de <i>L. prolificans</i> | 107 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA..... | Página |
|--|--------|
| 1. Ciclo biológico de los Ascomicetos..... | 7 |
| 2. Anamorfo – <i>Scedosporium</i> | 9 |
| 3. <i>L. prolificans</i> | 9 |
| 4. Anamorfo – <i>Graphium</i> | 10 |
| 5. Teleomorfo – <i>Pseudallescheria</i> | 10 |
| 6. Representación esquemática de los genes y los espaciadores internos del ADNr..... | 24 |
| 7. Esquema de la estrategia general seguida para la identificación fenotípica y molecular de aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> en México..... | 41 |
| 8. Cultivo obtenido a partir de una muestra de suelo en medio ADRB con benomilo, mostrando colonias típicas de <i>P. boydii</i> | 44 |
| 9. Amplificación parcial del gen de ITS del ARNr (~600pb)..... | 63 |

| | |
|--|----|
| 10. Representación esquemática de la prevalencia de las especies del complejo <i>Scedosporium</i> | 64 |
| 11. Representación esquemática del árbol filogenético de las especies <i>S. apiospermum</i> , <i>S. dehoogii</i> y <i>S. aurantiacum</i> . Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 90% como se indica en los nodos | 69 |
| 12. Representación esquemática del árbol filogenético de las especies <i>S. boydii</i> , <i>P. angusta</i> y <i>P. fusioidea</i> . Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 90% como se indica en los nodos | 70 |
| 13. Representación esquemática del árbol filogenético de <i>P. ellipsoidea</i> . Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 90% como se indica en los nodos..... | 71 |
| 14. Representación esquemática del árbol filogenético de la especie <i>L. prolificans</i> . Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 95% como se indica en los nodos..... | 73 |
| 15. Regiones variables de la secuencia de 476 nucleótidos del gen del ITS del ADNr de los aislamientos clínicos de <i>L. prolificans</i> | 74 |

| | |
|--|----|
| 16. Texturas de las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 75 |
| 17. Tipo de borde presente en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 76 |
| 18. Producción de exudado en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 77 |
| 19. Producción de pigmento amarillo difusible al medio en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 77 |
| 20. Diferentes colores presentes en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 78 |
| 21. Características morfológicas microscópicas presentes en las especies del complejo <i>Scedosporium</i> | 80 |
| 22. Características morfológicas microscópicas de <i>L. prolificans</i> | 81 |
| 23. Crecimiento de los aislamientos clínicos y ambientales a diferentes temperaturas del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. prolificans</i> | 82 |

| | |
|--|-----|
| 24. Distribución de los aislamientos ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> en los diferentes patrones de asimilación..... | 85 |
| 25. Distribución de los aislamientos clínicos del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. proliferans</i> en los diferentes patrones de asimilación..... | 86 |
| 26. Actividad proteasa y fosfolipasa positiva..... | 87 |
| 27. Distribución de los aislamientos ambientales del complejo <i>Scedosporium</i> en los diferentes patrones de actividad enzimática..... | 89 |
| 28. Distribución de los aislamientos clínicos del complejo <i>Scedosporium</i> y <i>L. proliferans</i> en los diferentes patrones de actividad enzimática..... | 90 |
| 29. Cortes histopatológicos de cerebro de cepas de <i>S. apiospermum</i> teñidos con hematoxilina-eosina a los días 3, 6 y 15 post-infección..... | 99 |
| 30. Cortes histopatológicos de cerebro de cepas de <i>S. apiospermum</i> teñidos con Gomori-Grocott a los 3, 6 y 15 días post-infección..... | 100 |
| 31. Cortes histopatológicos de bazo de cepas de <i>S. apiospermum</i> teñidos con hematoxilina-eosina a los días 3, 6 y 15 post-infección..... | 101 |
| 32. Cortes histopatológicos de bazo de cepas de <i>S. apiospermum</i> teñidos con Gomori-Grocott a los 3, 6 y 15 días post-infección..... | 102 |

| | |
|--|-----|
| 33. Cortes histopatológicos de riñón de cepas de <i>S. apiospermum</i> teñidos con hematoxilina-eosina a los días 3, 6 y 15 post-infección | 103 |
| 34. Cortes histopatológicos de riñón de cepas de <i>S. apiospermum</i> teñidos con Gomori-Grocott a los 3, 6 y 15 días post-infección..... | 104 |
| 35. Estudio de supervivencia en un modelo murino de infección sistémica por diferentes cepas de <i>L. proliferans</i> | 105 |
| 36. Cortes histopatológicos de cerebro teñidos con hematoxilina-eosina a los días 4, 7 y 10 post-infección con <i>L. proliferans</i> | 108 |
| 37. Cortes histopatológicos de cerebro teñidos con Gomori-Grocott a los días 4, 7 y 10 post-infección con <i>L. proliferans</i> | 109 |
| 38. Correlación entre la identificación molecular y la zona geográfica de las especies del complejo identificadas en México..... | 111 |
| 39. Correlación entre la identificación molecular y sitios de aislamiento de las especies del complejo identificadas en México..... | 112 |
| 40. Correlación entre la identificación molecular y pH del suelo de los aislamientos de las especies del complejo identificadas en México..... | 113 |

| | |
|---|-----|
| 41. Correlación entre la identificación molecular y la actividad proteasa y fosfolipasa de los aislamientos de las especies del complejo identificadas en México | 114 |
| 42. Correlación entre la identificación molecular y el origen de los aislamientos clínicos de <i>L. prolificans</i> y las especies del complejo identificadas en México | 116 |
| 43. Correlación entre la identificación molecular y la actividad proteasa y fosfolipasa de los aislamientos clínicos de las especies del complejo identificadas en México | 117 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|---|
| A | Adenina |
| ABC | Albaconazol |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNmt | Ácidodesoxirribonucleico mitocondrial |
| ADNr | Ácido desoxirribonucleico ribosomal |
| ADRB | Agar Dicloran Rosa de Bengala |
| AFLP | Fragmentos de amplificación polimórfica |
| AMB | Anfotericina B |
| ANI | Anidulafungina |
| APD | Agar papa dextrosa |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribosomal |
| ATTC | American Type Cultura Collection |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| C | Citosina |
| CAS | Caspofungina |
| CD14 | Cluster of differentiation 14 |
| CLSI | Clinical Laboratory Standards Institute |
| cm² | Centímetro cuadrado |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| CME | Concentración mínima efectiva |

| | |
|---------------------------------|---|
| CREI | Centro Regional de Enfermedades infecciosas |
| CTAB | Cetyltrimethylammoniumbromide |
| DMSO | Dimetil sulfóxido |
| dNTP's | Desoxiribonucleótidos |
| EF 1-α | Factor de elongación 1 alfa |
| EDTA | Di-sodiummethylenediaminetetra-cetate.2H ₂ O (Di-sodio etilenediaminetetra-acetato. 2H ₂ O) |
| FCT | 5-flucitocina |
| FLC | Fluconazol |
| G | Guanina |
| g | Gramos |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| hr | Horas |
| IGS | Espaciador intergénico |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| INEGI | Instituto Nacional de Estadística y Geografía |
| ITC | Itraconazol |
| ITS | Espaciador interno |
| ISA | Isavuconazol |
| KTC | Ketoconazol |
| kDa | Kilodalton |
| L | Litro |
| LAMP | Amplificación isotérmica cíclica |
| LOG₁₀ | Logaritmo base 10 |

| | |
|-----------------|--|
| M | Molar |
| MCF | Micafungina |
| MG | Media geométrica |
| mg | Miligramo |
| min | Minutos |
| mL | Mililitro |
| ML | Máxima verosimilitud |
| mM | Milimolar |
| MyD88 | Myeloid differentiation primary response gene 88 |
| n | Número |
| ng | Nanogramo |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| NCCLS | National Comite for Clinical Laboratory Standards |
| NL | Nuevo León |
| PAMP's | Patrones moleculares asociados a patógenos |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PCR- RLB | PCR de hibridación inversa |
| POS | Posaconazol |
| RAPD | Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de DNA |
| RAVU | Ravuconazol |
| RCA | Amplificación cíclica |

| | |
|--------------------------------------|--|
| RFLP | Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción |
| RVC | Ravuconazol |
| s | Segundos |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| T | Timina |
| TBF | Terbinafina |
| TE | Tris-EDTA |
| TLR2 | Receptor tipo Toll 2 |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral alfa |
| UANL | Universidad Autónoma de Nuevo León |
| UFC | Unidad formadora de colonia |
| VRC | Voriconazol |
| Xg | Fuerza centrífuga |
| μg | Microgramos |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrómetros |
| μM | Micromolar |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grado centígrado |
| % | Por ciento |

RESUMEN

M.C. Mariana Elizondo Zertuche

Fecha de obtención del grado: Enero del 2015

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Título del estudio: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS Y AMBIENTALES DEL COMPLEJO *Pseudallescheria boydii*.

Número de Páginas:148

Candidata al Grado de Doctor en Ciencias con orientación terminal en Microbiología Médica.

Área de estudio: Microbiología.

Propósito y Método de estudio:A nivel mundial la scedosporiosis es una micosis emergente con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y de difícil tratamiento, cuya incidencia es cada vez mayor en pacientes inmunocomprometidos. Recientemente con base en hallazgos moleculares, se demostró que *P. boydii* es un complejo, por lo que es importante llegar a una identificación precisa de sus especies. El objetivo principal de este trabajo fue aislar y caracterizar muestras clínicas y ambientales del complejo *Pseudallescheria boydii* por medio de estudios fenotípicos y moleculares. Se recolectaron 101 muestras ambientales de suelo de distintas áreas y regiones geográficas de México, además se recolectaron los datos clínicos y epidemiológicos de 17 muestras de pacientes con diagnóstico mediante cultivo de scedosporiosis las cuales fueron recolectadas en un período de 13 años (2000 - 2013) en el Centro Regional de Enfermedades infecciosas (CREI) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UANL., del estado de Nuevo León. A todos los aislamientos clínicos y ambientales se les realizó identificación microbiológica mediante la observación macroscópica y microscópica, pruebas fisiológicas, enzimáticas y la identificación molecular para obtener la identificación definitiva mediante secuenciación de una región parcial del ITS del ADNr. Posteriormente se llevó a cabo la determinación del pH y nitrógeno total de las muestras de suelo positivas. Se llevó a cabo el estudio de susceptibilidad *in vitro* a diferentes antifúngicos. Por otro lado, partiendo de la identificación molecular se realizó el estudio de carga fúngica e histopatología en un modelo murino de scedosporiosis sistémica. Por último se siguió con el análisis estadístico para establecer posibles correlaciones entre los hallazgos fenotípicos y genotípicos con las características ambientales, geográficas y epidemiológicas de las especies obtenidas.

Conclusiones y contribuciones: Se llevó a cabo un estudio filogenético basado en el análisis de una región parcial del ITS del ADNr, lo que corroboró que el complejo de *Scedosporium* está compuesto por una variedad de especies crípticas. La secuenciación de la región parcial del gen del ITS del ADNr aportó información filogenética para la identificación de las especies del complejo, sin embargo; es necesaria la secuenciación de otros genes conservados como β -tubulina, región D1 y D2 del ADNr, calmodulina, etc., para corroborar esta identificación.

Se logró el aislamiento de 7 especies del complejo *Scedosporium* (*S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoides* y *P. ellipsoidea*), así como también cepas de *L. prolificans* a partir de aislamientos clínicos. Se logró el aislamiento de las especies del complejo a partir de distintos orígenes y áreas geográficas del país, destacando a *Scedosporium apiospermum* como la especie más ampliamente distribuida en México. El sitio donde se obtuvieron el mayor número de aislamientos fue de jardín urbano y parques industriales.

Mediante las determinaciones fisiológicas no fue posible llegar a una identificación precisa de las especies del complejo. Se demostró que todas las especies del complejo obtenidas son muy resistentes *in vitro* a los antifúngicos convencionales. Los aislamientos de *L. prolificans* fueron los que mostraron mayor resistencia a todos los antifúngicos probados. *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *L. prolificans* fueron las especies más virulentas en un modelo murino de infección sistémica sin inmunosupresión.

Dr. C. Gloria María González González
Director de tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre el género *Scedosporium*

Scedosporium es un género de ascomicetos que pertenece a la familia *Microascaceae* [1]. Este género se caracteriza por presentar una morfología polimórfica, ya que pueden presentar hasta tres formas diferentes; una forma sexual o teleomorfa y dos formas asexuales o anamorfos [2,3]. Estas dos formas asexuales se clasifican en los géneros *Scedosporium* y *Graphium* [4]. El género teleomorfo (*Pseudallescheria*) se caracteriza por la producción de cuerpos fructíferos llamados peritecios (abiertos) o cleistotecios (cerrados), esféricos, con paredes finas, membranáceas y de textura rugosa [5]. Los ascos son esféricos, de paredes delgadas, evanescentes y contienen generalmente ocho ascosporas. Dichas ascosporas son frecuentemente simétricas, elipsoidales o fusiformes. El anamorfo *Scedosporium*, posee conidióforos frecuentemente no ramificados, los cuales son portadores de células conidiógenas anelídicas, es decir, a medida que producen los conidios, éstos, tras su liberación, dejan una serie de cicatrices anulares en el cuello de las mismas [6,7]. Dichas células conidiógenas o anélides pueden crecer incluso directamente de hifas indiferenciadas. Los conidios suelen tener forma ovoide y son de color marrón.

Por otro lado, en género *Graphium* posee conidióforos ramificados, los cuales se organizan en forma de sinemas o coremios. El coremio consiste en la unión de varios conidióforos que forman un tronco erguido, de color amarillo-marrón, estos terminan en una especie de cepillo de células conidiógenas delgadas en cuyo ápice se acumulan los conidios. La conidiogénesis es similar a la de *Scedosporium*, pero las células conidiógenas son más pequeñas y los conidios más estrechos y menos pigmentados [3]. Este anamorfo no siempre está presente en los cultivos.

1.2 Historia

El género *Pseudallescheria* ha sufrido diversos cambios en su nomenclatura y ubicación a nivel de familia. Su historia inicia en 1922 con la descripción de la primera especie del género, *Pseudallescheria boydii*, que recibió inicialmente el nombre de *Allescheria boydii* [5]. En 1970 pasó a formar parte de la familia *Microascaceae*, pero bajo el nombre de *Petriellidium malloch* [8]. El nombre del género *Pseudallescheria* fue propuesto en el año 1944 por Negróni y Fischer para denominar a un ascomiceto, *Pseudallescheria shearii*, aislado de un micetoma humano [1], sin embargo, McGinnis y col. (1982) determinaron que *Petriellidium boydii* y *Pseudallescheria shearii* era el mismo hongo. Así el género *Pseudallescheria* incluiría finalmente las siguientes especies: *Pseudallescheria africana*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria boydii*, *Pseudallescheria desertorum*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, *Pseudallescheria fimeti* y *Pseudallescheria fusoidea* [2, 4, 9, 21].

Todas estas especies son morfológicamente muy similares y se distinguen principalmente por el tamaño de sus cleistotecios y de sus ascosporas [10], tabla 1.

Tabla 1. Características morfológicas más relevantes de las especies de *Pseudallescheria*.

| Especie | Cleistotecios (diámetro en μm) | Ascosporas | |
|-------------------------------------|---|--------------------------------------|--------------|
| | | Tamaño/diámetro (μm) | Forma |
| Teleomorfo of <i>S. apiospermum</i> | 140 - 480 | 7-8 x 4-5 | fusiformes |
| <i>P. angusta</i> | 55 - 110 | 5.5-6.5 x 3-3.5 | fusiforme |
| <i>P. boydii</i> | 55 - 200 | 6-9 x 5-6 | fusiformes |
| <i>P. desertorum</i> | 80 - 110 | 11-14 x 7.5-10 | elipsoidales |
| <i>P. ellipsoidea</i> | 55 - 150 | 7-9 x 5-6 | elipsoidales |
| <i>P. fusoidea</i> | 50 - 160 | 6-7 x 4-4.5 | fusiformes |
| <i>P. minutispora</i> | 50 - 150 | 5-7 x 3-4 | elipsoidales |

A partir del análisis de secuencias de los espaciadores intergénicos (ITS) del ADNr realizados por Rainer y *col.* (2000) se encontró que *P. angusta*, *P. ellipsoidea* y *P. fusoidea* eran especies sinónimas de *P. boydii* [11]. En el 2005 Gilgado y *col.*, base a la secuenciación de varios genes conservados (ITS, β -tubulina y calmodulina) determinaron que este grupo de microorganismos son un complejo de 8 especies distintas, *P. boydii* sensu estricto (anamorfo *Scedosporium boydii*), *P. minutispora*, *S. aurantiacum*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*, éstas últimas tres especies eran distintas pero estrechamente cercanas a *P. boydii* [12]. Posteriormente en el 2008 estos mismos investigadores en base a estudios de análisis genéticos de una región parcial del gen β -tubulina propusieron dos nuevas especies para este complejo *S.*

apiospermum (teleomorfo *Pseudallescheria apiosperma*) determinando que esta especie no es el anamorfo de *P. boydii* y *S. dehoogii* [13].

Por otro lado, el anamorfo *Scedosporium* fue descrito por primera vez en el año 1911 y recibió el nombre de *Monosporium apiospermum*, a partir de una cepa aislada de un micetoma. Sin embargo, en la revisión realizada por Castellani y Chalmers en 1919 se recibe en el nuevo género *Scedosporium* y es a partir de entonces denominada como *S. apiospermum* [14]. No obstante, no fue hasta 1944 donde se relacionó a *S. apiospermum* como el anamorfo (fase asexual) de *P. boydii* ya que los pacientes infectados con estos microorganismos presentaban datos clínicos similares y el anamorfo asociado a *P. boydii* era morfológicamente similar a *S. apiospermum* [15]. Actualmente se sabe que *S. apiospermum* es un especie completamente diferente y se ha nombrado a *Pseudallescheria apiosperma* como el teleomorfo (fase sexual) de *S. apiospermum* [10].

Graphium eumorphum fue descrito en el año 1886 por Saccardo. Inicialmente situó a esta especie en el género *Sporocybe*, pero fue el mismo autor quien a través de un estudio del género *Graphium* emplazó a esta especie en este último género [16-18]. Más tarde fue considerada una segunda fase asexual de *P. boydii*, pero Okada y col. (1998) comprobaron que *G. eumorphum* era una especie diferente de *P. boydii*. [19]. Actualmente se emplea únicamente el nombre de *Graphium* para denominar al anamorfo de *P. boydii*. Sin embargo, hoy en día pese a su creciente importancia en la clínica, son aún pocos los estudios realizados sobre esta especie.

Recientemente Lackner y col. (2014), realizaron una revisión de *Pseudallescheria*, *Scedosporium* y géneros relacionados proponiendo cambios en el código internacional de nomenclatura en el uso de los nombres por separado para los estados sexual y asexual de estos hongos, considerando que el nombre de *Scedosporium* tiene prioridad sobre el de *Pseudallescheria* proponiendo los siguientes cambios: en primer lugar *Scedosporium prolificans* el cual es filogenéticamente distinto de otras especies de *Scedosporium*, será nombrado *Lomentospora prolificans* mientras *Pseudallescheria minutispora* se renombrará como *Scedosporium minutisporum*; por otra parte el estatus taxonómico de *P. angusta*, *P. ellipsoidea*, *P. fusioidea* y *S. deficiens* se encuentran aún bajo investigación por lo tanto la nomenclatura para estas especies no tendrá cambio [20].

1.3 Biología y ecología

El ciclo biológico de *P. boydii* (Figura 1), consiste en el desarrollo de una fase sexual o teleomorfo, caracterizado por la producción de esporas sexuales (ascosporas), y una fase asexual o anamórfica. En esta fase, no solo se desarrolla una única forma asexual productora de conidios, sino también es capaz de producir dos anamorfos, como se describió anteriormente. Uno de ellos se le conoce con el nombre de *Scedosporium*, el cual siempre se encuentra en los aislados del complejo y el otro anamorfo llamado *Graphium* se desarrolla con mucha menos frecuencia especialmente en cultivos envejecidos, pero se ha

visto que ambas formas pueden estar presente en los aislamientos del complejo de *Scedosporium* [3, 10, 21].

El nicho natural de *P. boydii* es poco conocido, pero se aísla con frecuencia de suelos y aguas altamente contaminadas. Son hongos cosmopolitas, que se encuentran preferentemente en regiones con climas templados y tropicales, el aislamiento de estos hongos está relacionado íntimamente con suelos donde se presenta actividad humana (zonas industriales, urbanas, parques públicos y jardines de casa habitación, etc.); sin embargo no se ha logrado su aislamiento de áreas naturales como selva o bosques. También se ha aislado del guano de palomas, gallinas, murciélagos, y en algunos anfibios, lo que pone de manifiesto el requerimiento de altas concentraciones de nitrógeno y bajo pH para su reproducción. Este tipo de microorganismo es capaz de tolerar altas concentraciones sal (5%), bajas concentraciones de oxígeno y una alta presión osmótica. *L. prolificans* en cambio se ha aislado de suelo y animales como gatos, caballos, lo anterior sugiere un hábitat más restringido al suelo y las plantas. *S. apiospermum* posee una amplia distribución a nivel mundial en cambio *L. prolificans* está restringido a la parte norte de la península Ibérica y Australia, así como también en California y el sur de los Estados Unidos [21]. Dicho fenómeno hace suponer la adaptación de estas especies con éxito a ambientes dominados por el hombre, además, podría existir un proceso de competición entre los genotipos, seleccionándose aquellos capaces de sobrevivir en estos ambientes [22].

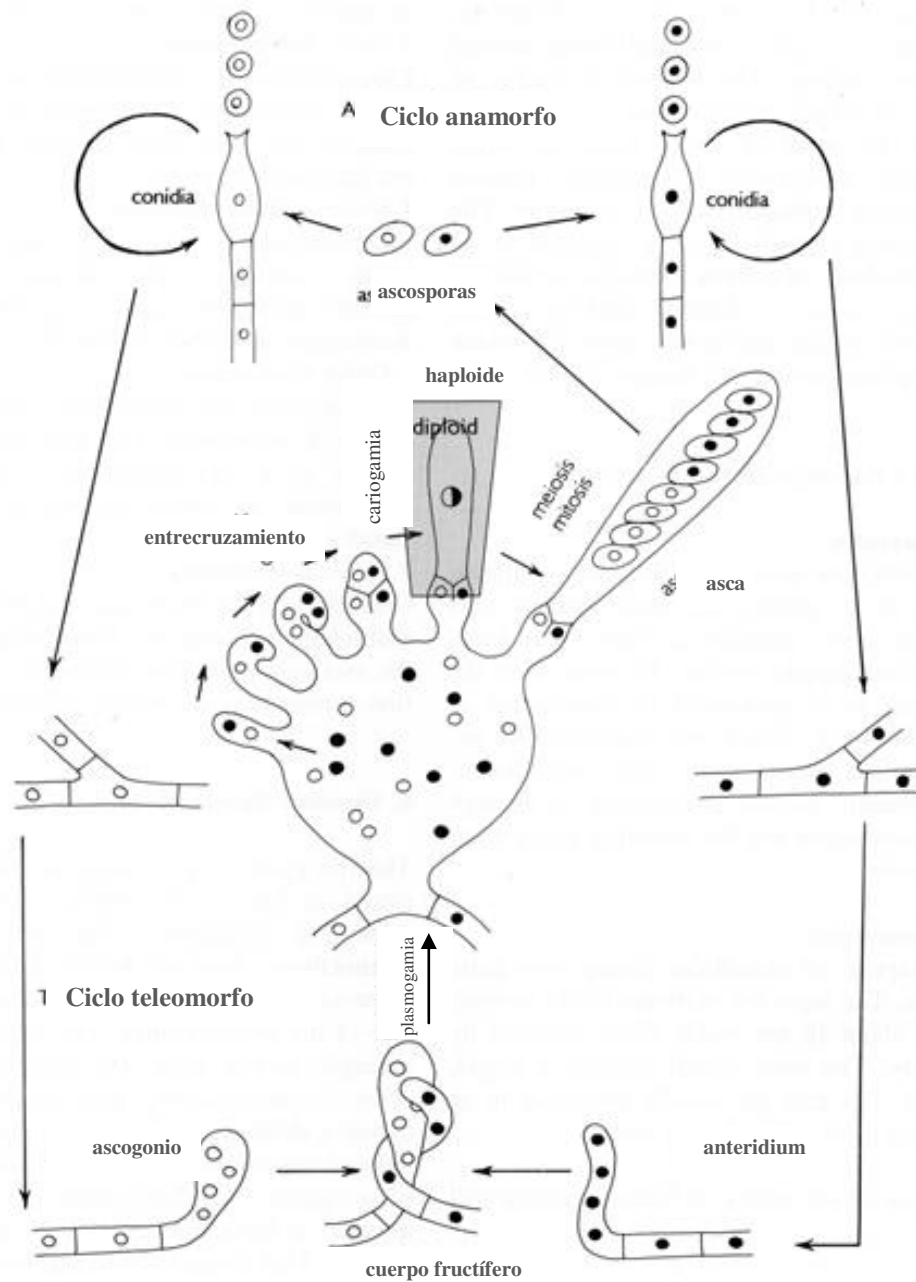


Figura 1. Ciclo biológico de los Ascomicetos, tomado de Atlas of Clinical Fungi, de Hoog y col., 2000.

1.4 Características fenotípicas

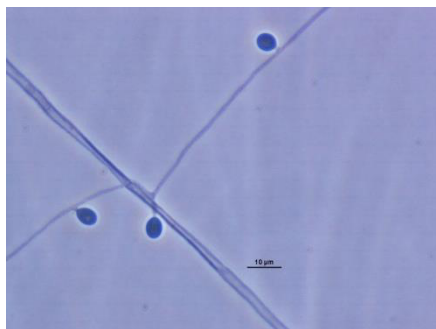
En base a las condiciones de crecimiento que presentan estos microorganismos son considerados de crecimiento rápido a 25 °C en agar dextrosa Sabouraud, donde en 7 días son capaces de desarrollar estructuras de reproducción que permiten su identificación. Sin embargo, estos hongos pueden crecer a temperaturas desde los 30 a 45°C. Son anaerobios facultativos, son considerados hongos hialinos, sin embargo se ha observado una pigmentación oscura en sus conidios relacionada con producción de pigmentos melánicos, las colonias tienen aspecto algodonoso o aterciopelado, planas de bordes definidos o irregulares, lo cual los diferencia de *L. prolificans*. El color de la colonia inicialmente es blanco y conforme madura va adquiriendo coloraciones marrón grisáceas en base a la producción de sus conidios [21].

No todas las cepas de *S. boydii* tienen la capacidad de desarrollar el teleomorfo, aunque su formación se ve favorecida con la siembra de las mismas en agar harina de avena o en medios pobres como el agar papa zanahoria. Los ascomas se caracterizan por ser de color amarillo parduzco o negro, esféricos y con un diámetro de 140 a 200 µm, los cuales acostumbran a formarse sumergidos en el agar. En el interior del ascoma se producen las ascosporas que son de forma elipsoidal, de color dorado y su tamaño oscila entre 6-7 x 3.5-4 µm de diámetro [5, 21].

Algunas cepas nunca originan ascomas pero en cambio, la forma *Scedosporium* siempre se desarrolla. Ésta se caracteriza por tener células

conidiógenas anelídicas, hialinas, que pueden surgir de hifas indiferenciadas. Las células conidiógenas producen conidios de un tamaño de 4-9 x 6-10 µm. *S. apiospermum* se distingue fácilmente de la otra especie del género, *L. prolificans*, porque sus células conidiógenas son cilíndricas, mientras las de *L. prolificans* son infladas en su base y con frecuencia nacen de conidióforos ramificados.

Tal y como ocurre en el teleomorfo, el anamorfo *Graphium* no siempre está presente. Éste, como ya hemos comentado anteriormente, se caracteriza por la formación de coremios. La conidiogénesis es similar a la del anamorfo *S. apiospermum*, y los conidios que originan suelen ser claviformes, subhialinos o marrones pálido, de base trunca, y su tamaño oscila entre 6-12 x 3.5-4 µm de diámetro. Dichos conidios son mucosos y se acumulan en el ápice del conidióforo formando grandes masas de color amarillo o grisáceo [3, 21]. (Figuras 2-5).



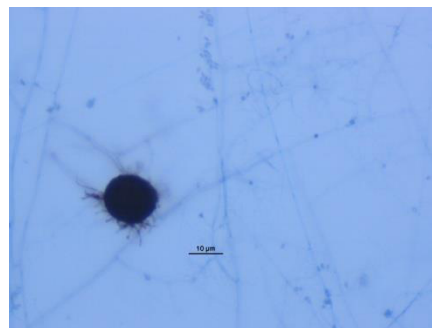
(2) Anamorfo –*Scedosporium*.



(3) *L. prolificans*.



(4) Anamorfo –*Graphium*.



(5) Teleomorfo –*Pseudallescheria*.

Desde el punto de vista fisiológico, las especies del complejo *Scedosporium apiospermum*, toleran elevadas concentraciones de cloruro de magnesio (5%) más que altas concentraciones de cloruro de sodio; son hongos proteolíticos y amilolíticos, tienen la capacidad de asimilar urea, asparagina, nitrato de potasio y nitrato de amonio, además de azúcares como: lactosa, sacarosa, maltosa, D-ribosa, manitol y L-arabinitol así como crecen en presencia de cicloheximida (8 mg/mL). Bajo estos parámetros fisiológicos se pueden diferenciar claramente las cepas del complejo *Scedosporium apiospermum* de las de *L. prolificans*, sin embargo; estas características fisiológicas no determinan una identificación precisa de las especies del complejo [13,21, 23].

En el 1996 Larcher y *col*, describió por primera vez la producción de una proteasa extracelular de 30 kDa; sin embargo, Santos y *col*., reportan en una revisión algunas moléculas como factores de virulencia entre ellos están los glucanos, peptidoglicanos, glicolípidos (glicoceramidas) y enzimas hidrolíticas catalogadas como: proteasas (clase metaloproteasas), fosfolipasas y superóxido dismutasa, las cuales están implicadas en algunos procesos

fundamentales para el hongo como crecimiento, diferenciación e interacción con las células del hospedero [24].

Los peptidoramnomanos son polisacáridos y peptidopolisacáridos que juegan un papel muy importante en la arquitectura celular fúngica y algunas de estas moléculas actúan como mediadores que regulan la patogénesis y la respuesta inmune del hospedero, dichas moléculas pueden ser reconocidas ampliamente por los anticuerpos del suero por lo tanto estas moléculas pueden ser utilizadas como pruebas diagnósticas en la scedosporiosis y posibles blancos para estudios de antígenos presentes en la pared celular de estos hongos. [24].

Por otra parte, los glucanos son patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) reconocidos por los receptores tipo Toll, se ha determinado que la respuesta inmunológica a las infecciones fúngicas es en parte dependiente de la interacción de (PAMP's) con los receptores de los fagocíticos. Los α -glucanos de *P. boydii* tienen una gran relevancia en la virulencia ya que están involucrados con la inhibición de la fagocitosis de manera dosis dependiente, por ejemplo una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de α -glucano es capaz de inhibir el 50% del proceso de fagocitosis [24]. Estas moléculas también juegan un papel muy importante en la internalización del conidio al macrófago, en ensayos donde se retiran los α -glucanos por tratamiento enzimático conduce a una reducción significativa de la fagocitosis. En estudios *in vitro* empleando macrófagos de ratón estimulados con los conidios se induce la producción de $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 y estimula a las células dendríticas por medio de los receptores

TLR2, CD14 y MyD88 [24]. Por otra parte, los (1- 3) β -glucanos actúan como ligando para los receptores tipo Toll activando de esta manera la respuesta inmune celular, son un marcador importante en infecciones fúngicas invasivas cuando el paciente no ha recibido tratamiento [24, 26].

La actividad enzimática proteolítica en los hongos juega un papel muy importante en la patogenicidad ya que muchas de estas enzimas están íntimamente relacionadas con la invasión en las células del hospedero, se han descrito una gran variedad de enzimas líticas en géneros como *Candida*, *Aspergillus* y de manera particular para *P. boydii* se han descrito enzimas extracelulares como proteasas (clase metaloproteasas), fosfolipasas y superóxido dismutasa. El primer reporte de la producción de proteasas por parte de estos hongos fue en 1996 por Larcher y *col.*, ellos purificaron una proteína de 30 kDa que compartía muchas similitudes estructurales y bioquímicas con una serina proteasa de *A. fumigatus*, capaz de degradar el fibrinógeno sugiriendo un papel como mediador en el proceso inflamatorio crónico broncopulmonar en pacientes con fibrosis quística. Posteriormente se aislaron nuevas enzimas proteolíticas de la clase de las metaloproteasas de 20 – 90 kDa capaces de hidrolizar albúmina, caseína, hemoglobina e inmunoglobulina G, además, poseen capacidad para unirse a la componentes de la matriz extracelular como laminina y fibronectina y a moléculas de ácido siálico presente en las células epiteliales del tracto respiratorio lo que permite al hongo evadir la respuesta inmune innata. Estas enzimas son producidas en mayor concentración por el micelio comparado con los conidios, donde se ha observado que los conidios

producen una sola proteasa de 28 kDa y el micelio es capaz de producir hasta 6 metaloproteasas distintas entre los 28 - 90 kDa. La regulación de la producción de estas enzimas está dada por las etapas de crecimiento del hongo lo que representan un blanco importante en el estudio de sus características bioquímicas [24]. Las cepas de *Scedosporium/Pseudallescheria* son capaces de eliminar proteínas de la cascada del complemento como C3 y C1q mediante degradación proteolítica [24, 25].

Las fosfolipasas están involucradas en la invasión a los tejidos, se han descrito ecto-fosfolipasas en el micelio de *P. boydii*, capaz de hidrolizar diferentes sustratos (β -glicerolfosfato, fosfoaminoácidos: fosfoserina, fosfotirosina y fosfotreonina), éstas se producen tanto en condiciones ácidas como alcalinas lo que podrían estar involucradas en procesos de interacción celular y patogénesis; sin embargo, se conoce poco de los mecanismos involucrados en estos procesos. Por otra parte, se ha descrito también la producción de una superóxido dismutasa (SOD) la cual se ha caracterizado como una Cu, Zn-SOD, la cual se encuentra presente en el micelio de *P. boydii* dicha enzima posee una similitud de hasta el 83% con las proteasas de *A. fumigatus* y *Neurospora crassa*. De manera interesante, se ha observado que en bajas concentraciones de hierro el hongo excreta al medio sideróforos para captar esta molécula del ambiente extracelular y a la vez estimula los niveles de actividad de SOD para activar el mecanismo de protección antioxidativo [24].

1.5 Análisis molecular aplicado a la taxonomía de los hongos

En base a lo anterior, se puede pensar que el complejo *Scedosporium* son especies bien caracterizadas, no obstante numerosos trabajos demuestran una gran variabilidad intraespecífica en estas especies, tanto a nivel fenotípico como genético.

De Hoog y *col.* (1994) estudiando la homología entre el ADN nuclear de diferentes cepas de *P. boydii* encontraron la existencia de tres grupos intra-específicos bien diferenciados [21]. Rainer y *col.* (2000) comprobaron la existencia de hasta 5 longitudes diferentes en el gen 18S del ADNr. Williamson y *col.* (2001) encontraron hasta 20 genotipos en 52 aislados secuenciando la región IGS del ADNr. Defontaine y *col.* (2002) en un total de 129 aislados obtenidos de enfermos de fibrosis quística usando la técnica de los RAPD (Amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN) se encontraron hasta 60 genotipos diferentes. Con el análisis de las secuencias correspondientes a los ITS del ADNr, Rainer y *col.* (2000) demostraron también una alta variabilidad intra-específica, variabilidad genética que se ha encontrado en otros géneros como: *Trichophyton* spp., *Hortaea* spp., y *Cladophialophora* spp., [11, 23, 27 - 31].

La taxonomía, hasta hace poco tiempo, se basaba casi exclusivamente en las características morfológicas para delimitar las especies o los diferentes niveles taxonómicos. Sin embargo, dichas características presentan una serie de problemas asociados como es la dificultad de diferenciar hongos estrechamente

relacionados, la laboriosidad de sus métodos de estudio y, en algunos casos, incluso la insuficiente resolución para la delimitación de los taxones [32]. Es por ello que actualmente los taxónomos han recurrido a la biología molecular como una herramienta de apoyo para permitirles solucionar algunos de los problemas mencionados.

Hoy en día son numerosas las técnicas moleculares utilizadas para resolver problemas taxonómicos, muchas ya están en desuso y otras, como el análisis filogenético con múltiples genes, son las de elección.

El análisis del polimorfismo en patrones de restricción (RFLPs), basado en la digestión con enzimas de restricción de productos de amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas, es una técnica que se ha utilizado para clasificar cepas fúngicas dentro de una determinada especie, para ver conexiones anamorfo–teleomorfo, así como para establecer variabilidad genética entre cepas de una misma especie, un ejemplo es el ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADNr [33 - 37].

Por otra parte, las técnicas electroforéticas de RAPDs, se basan en la amplificación por PCR de regiones del genoma al azar, para ello se utilizan uno o varios iniciadores con una longitud de entre 10 y 12 nucleótidos que hibridan con regiones inespecíficas del genoma. Ha sido básicamente utilizada para el tipado de cepas de una misma especie, aunque el principal problema es la baja reproducibilidad de la técnica [38 - 41].

Otra de las técnicas utilizadas para la identificación de cepas fúngicas y tipado es la de los polimorfismos de fragmentos de amplificación (AFLPs). Esta técnica se basa en la unión de adaptadores al ADN genómico previamente digeridos, seguido de una PCR con iniciadores específicos para estos adaptadores que incluyen un isótopo radiactivo. Los patrones que se obtienen suelen tener entre 40 y 200 bandas. Sin embargo, la verdadera revolución en la taxonomía de los hongos ha tenido lugar con la secuenciación del ADN. El análisis de secuencias, especialmente de los fragmentos del ADNr, ha ayudado a los taxónomos a reorganizar la sistemática de los hongos de acuerdo a sus relaciones filogenéticas [42 - 47]. No obstante, en algunos grupos o taxones incluso el análisis del ADNr ha resultado poco informativo o insuficiente para dilucidar la ubicación taxonómica o incluso delimitarlo como especie. Es por ello que, en los últimos años, para los estudios de filogenia molecular se tiende a utilizar, además del ADNr, el análisis comparativo de las secuencias de más de un gen, y se han seleccionado principalmente aquellos genes que codifican proteínas.

1.5.1 Identificación molecular del complejo *Scedosporium apiospermum*

Como se ha mencionado anteriormente, este complejo de especies tiene una amplia variabilidad inter especie lo que ha llevado a la aplicación de distintas pruebas moleculares para poder dilucidar las especies que lo conforman, debido a su distinta virulencia y sensibilidad a los antifúngicos convencionales. La

secuenciación de genes conservados además del ITS del ADNr ha sido fundamental para la identificación de estas especies.

Gilgado y *col.*, (2005) analizaron 60 aislamientos clínicos y ambientales del complejo de *Scedosporium apiospermum* mediante secuenciación de tres regiones parciales de los genes β -tubulina, calmodulina e ITS del ADNr. De acuerdo al análisis de estas regiones, se encontraron que tres especies anteriormente relacionadas como sinónimos de *P. boydii* eran especies distintas (*P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*), así como también propusieron dos nuevas especies *P. minutispora* y *S. aurantiacum*. Posteriormente Rainer y *col.*, mediante el análisis filogenético a partir de la región parcial del ITS y de la subunidad larga del ADNr lograron diferenciar especies de *Pseudallescheria*, *Petriella* y *L. prolificans*. Sin embargo, para el 2007 Zeng y *col.*, establecieron mediante el análisis de las secuencias parciales de la subunidad larga de la región D1/D2, del ITS del gen del ADNr y una región parcial del gen del factor de elongación 1- α (EF 1- α) que existe una amplia variabilidad genética entre las especies del complejo *S. apiospermum*, en este mismo trabajo establecieron que la región D1/D2 es suficientemente variable para llevar a cabo una identificación precisa de todas las especies en comparación con los genes del ITS del ADNr y EF 1- α [12, 48, 49].

Posteriormente en el 2008 Gilgado y *col.*, a partir de 141 aislamientos del complejo de *Scedosporium apiospermum* mediante el análisis de la región parcial del gen de β -tubulina, proponen dos nuevas especies: *S. dehoogii* y *S. apiospermum* está última se identificó como una especie distinta del anamorfo

de *P. boydii* por lo tanto proponen designar el nombre de *Scedosporium boydii* al anamorfo de ésta. También proponen a la secuencia parcial de β -tubulina como un buen marcador de identificación para estos microorganismos. Desde entonces se han implementado una amplia variedad de pruebas moleculares a partir de esta secuencia como PCR tiempo real, LAMP (amplificación isotérmica cíclica), PCR- RLB (PCR de hibridación inversa), FTA-LAMP, RFLP, PCR-rep (prueba semiautomática repetitiva de PCR) y RCA (amplificación cíclica), las cuales han mostrado especificidad variable y solo se ha conseguido identificar algunas de las especies, es por ello que hasta hoy en día la técnica de secuenciación de distintos genes siguen siendo el estándar de oro para llegar a una identificación precisa de estas especies [13, 50 - 53].

1.5.2 Filogenia molecular

La filogenia molecular es el estudio de la evolución de los organismos a través del análisis de sus secuencias de ADN o de aminoácidos. La filogenia nos proporciona el fundamento para la clasificación de los organismos; mediante ésta es posible establecer una comparación con moléculas de ADN de diversos organismos, ya que están formadas por el mismo lenguaje de bases [54, 55].

Las relaciones filogenéticas entre organismos basadas en las secuencias de ADN o de proteínas, se ilustran mediante un árbol filogenético, el cual nos muestra los organismos que están más íntimamente relacionados. Estos árboles incluyen un conjunto de nodos conectados por ramas (o ejes). Los nodos

terminales representan las secuencias conocidas de los organismos, los nodos internos representan divergencias ancestrales entre dos o más grupos de organismos genéticamente aislados, es decir, los ancestros hipotéticos que comparten estos grupos; cada nodo interno está unido a una rama (internodo) representante de la evolución desde su ancestro y del mismo pueden partir dos o más ramas que representan a sus descendientes. El ancestro de todos los taxones que forman el árbol es la raíz del mismo; la longitud de las ramas en los árboles puede representar en algunos análisis, las distancias evolutivas que separan los nodos y la topología del árbol es la información aproximada de las relaciones entre dichos taxones

Los diferentes métodos de inferencia filogenética como la máxima parsimonia, neighbor-joining, máxima verosimilitud, etc., tienen como resultado la construcción de estos árboles, en los cuales las diferencias entre secuencias homólogas de los organismos incluidos son el resultado de los procesos evolutivos que han sufrido cada uno de ellos (Tesis 2007, Gilgado y *col*).

1.5.2.1 Inferencia filogenética

La reconstrucción de las relaciones evolutivas entre un grupo de organismos a partir de datos moleculares requiere de un trabajo riguroso. Existen múltiples programas para inferir filogenias, pero el procedimiento a seguir para la obtención de los árboles filogenéticos es común y consiste en: el diseño del muestreo, la secuenciación y alineamiento de las secuencias, el

análisis de los datos, la inferencia filogenética y el soporte de los arboles obtenidos.

Para obtener un buen muestreo taxonómico, éste debe de ser lo más grande y diverso posible, y se debe escoger un grupo externo (outgroup) lo más cercano posible a las muestras en estudio (ingroup). El outgroup permite “enraizar” el árbol filogenético, dándole una dirección. Éste puede estar formado por uno o más organismos, los cuales se saben que son distantes de las muestras en estudio. Para realizar una mejor inferencia se recomienda que el outgroup sea cercano al grupo de estudio ya que de este modo compartirán caracteres históricamente similares. También se recomienda incluir un amplio número de outgroups, pues esto permitirá que los resultados sean más estables. Lo siguiente es realizar el alineamiento de las secuencias a estudiar, en este paso se puede identificar si las secuencias son o no homólogas, seleccionando solamente las posiciones claramente homólogas, evitando aquellas posiciones dudosas [56 – 59, 117]. Posteriormente se realiza el análisis de los datos, previo a la reconstrucción filogenética, este análisis aporta información de cómo son y cómo se comportan los datos.

Existen diversos métodos para el estudio filogenético de los organismos, todos ellos tienen un mismo objetivo: estimar una historia evolutiva lo más próxima posible a la realidad a partir de los datos moleculares de que se disponen. De entre los métodos para inferir filogenia, los más utilizados por los taxónomos moleculares son: el Neighbor-joining, el cual un método algorítmico que calcula la distancia entre dos taxones, entendida ésta como una medida de

su similitud genética, y que se relaciona directamente con sus relaciones filogenéticas. Las distancias genéticas se corrigen para tener en cuenta los posibles cambios super impuestos, es decir, cambios que se producen en una misma posición. Así la matriz de caracteres se transforma en una matriz de distancias que representa el grado de diferencia entre los diferentes taxones. A partir de esta matriz de distancias se construye un árbol inicial en forma de estrella. Este árbol se va, construyendo a medida que se unen los nodos con las distancias más cortas. El hecho de ser un método de análisis rápido hace que sea muy empleado, sin embargo presenta inconvenientes: la topología del árbol varía según el orden de los taxones en el alineamiento, sólo muestra un árbol, y utiliza modelos evolutivos. [60 – 62, 117].

El método de máxima parsimonia, supone que el camino evolutivo más probable es el más simple, el que se explica con el menor número de cambios. Esta metodología utiliza las secuencias obtenidas intactas y selecciona los árboles con el menor número de pasos evolutivos. Esta sencillez y la ausencia de modelo evolutivo son las ventajas que presenta este método. Pero es justamente esta ausencia de modelo evolutivo la crítica más grande, ya que contra más divergentes son las secuencias, más grande es el grado de homoplasia, y si ésta no se corrige, la máxima parsimonia falla al recuperar el verdadero árbol. Otro problema se da cuando se introducen en el análisis taxones con tasas de sustitución más elevadas que el resto. A estos organismos se los denomina fast-clock (cambios genéticos rápidos), y en los árboles

aparecen en el extremo de ramas largas, generando topologías erróneas [63, 64, 117].

Por otra parte la máxima verosimilitudes un método estadístico utilizado para la construcción de filogenias, el cual considera todos los escenarios posibles que han podido dar lugar a las secuencias observadas y establecer sus probabilidades utilizando un modelo evolutivo. El análisis consiste en hallar el árbol más verosímil, es decir, aquel que hace más probable los datos observados. Este método tiene el problema que es computacionalmente muy costoso y requiere de computadoras de gran potencia. Es el método menos afectado por errores de muestreo o por la presencia de organismos fast-clock [65, 67, 117].

Y finalmente está el método de inferencia bayesiana, este se basa en el cálculo de la probabilidad posterior de un árbol, es decir, la probabilidad de que dicho árbol sea el correcto en función de los datos y el modelo evolutivo. La filosofía es ligeramente parecida a la máxima verosimilitud. Es un método rápido y aporta medidas probabilísticas de la robustez del árbol que son fácilmente comparables a las medidas de la estadística tradicional [68, 69, 117].

La última fase consiste en el soporte de los arboles obtenidos, ésta robustez se estima en base al soporte estadístico para cada una de las ramas del árbol o ver cuanto mejor es una topología obtenida respecto a otra, probando

así su fiabilidad, uno de estos métodos es el bootstrap el cual se basa en generar un número elevado de pseudoréplicas de la matriz original y analizarla utilizando cualquiera de los métodos de reconstrucción filogenética. Las pseudoréplicas se obtienen mediante el re-muestreo al azar con repeticiones de las columnas (caracteres) de la matriz original para obtener una nueva matriz del mismo tamaño que el original. El resultado final es el valor de bootstrap, éste indica el total de veces que una rama determinada se ha obtenido en el total de réplicas. Dicho valor se expresa en tanto por ciento, considerando solo aquellos grupos con un valor superior al 75% tienen un buen soporte estadístico [70, 117].

1.5.2.2 Genes empleados en la filogenia de los hongos

1.5.2.2.1 ADN ribosómico

El ADNr es la región del genoma fúngico más utilizada para estudios filogenéticos. Esta región ha sido seleccionada principalmente por el hecho de que los genes del ADNr son multicopia y están organizados en tándem de hasta 200 copias por núcleo, lo que asegura un mínimo de una copia intacta por núcleo pese a que la calidad del ADN sea baja. Las regiones del ADNr más comúnmente estudiadas son los tres genes codificantes 18S (1800 pb) el cual se ha utilizado para distinguir géneros pero no especies debido a la elevada similitud entre estas, el 5.8S (160 pb) se ha utilizado como punto de unión de iniciadores universales para amplificar las regiones espaciadoras flanqueates,

ITS1 e ITS2 y el 28S(3400 pb aproximadamente) el cual presenta regiones variables denominadas D1 y D2 que han permitido delimitar especies y categorías taxonómicas superiores [71 – 78, 117].

Por otra parte los dos espaciadores internos ITS1 e ITS2 (Figura 6), que flanquean el gen 5.8S muestran una gran variabilidad entre los eucariotas. La longitud de las secuencias de cada una de estas dos regiones varía desde más de 1000 pb en las células humanas hasta menos de 300 pb en algunas levaduras. Estas regiones han sido utilizadas en numerosos estudios como blanco para la identificación de especies fúngicas. También encontramos asociado a este complejo de genes la región espaciadora intergénica IGS con 2 regiones no codificadoras (ETS1 y ETS2). Todas estas regiones del ADN_r permiten realizar estudios filogenéticos a diferentes niveles taxonómicos [75, 79, 80, 117].

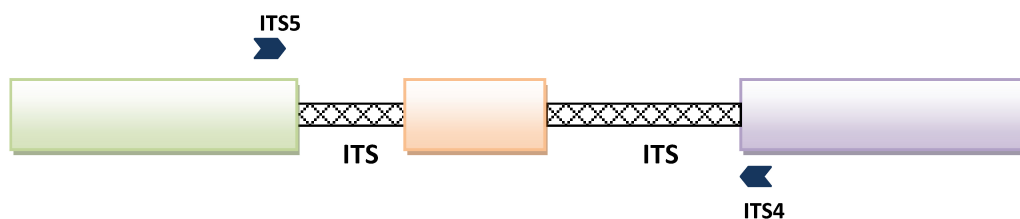


Figura 6. Representación esquemática de los genes y los espaciadores internos del ADN_r.

1.5.2.2 Otros genes utilizados en la filogenia de los hongos

Como ya se ha indicado anteriormente, la mayoría de los análisis filogenéticos en taxonomía de hongos estaban basados principalmente en las

secuencias del ADNr. Sin embargo, en determinados casos estas secuencias no han sido lo suficientemente, es por esto que en los últimos años se ha extendido el uso del análisis de múltiples genes codificantes de proteínas para los estudios filogenéticos, lo que ha demostrado que el análisis de múltiples loci puede aportar más resolución y permitir hacer hipótesis filogenéticas más fiables, un ejemplo de estos, son los genes de β -tubulina y la calmodulina, ambos han demostrado tener una gran eficacia para resolver problemas taxonómicos [81-85, 117].

El gen de la β -tubulina es uno de los más utilizados en los últimos años para el estudio de filogenias. Este gen pertenece a la superfamilia de las tubulinas, la cual presenta otras 4 familias que acompañan a la β -, como son la α -, γ -, δ -, y la ϵ -tubulina. La β -tubulina, junto con la α -, forman los microtúbulos y han mostrado que el gen de la β -tubulina aporta 3.5 veces más información filogenética que el gen 18S del ADNr mitocondrial[83, 117].

La calmodulina es una proteína que liga el calcio y medía el efecto de los iones calcio en numerosos sistemas biológicos, incluyendo señales de transducción, motilidad, secreción y regulación del ciclo celular. Este gen ha sido utilizado en numerosos estudios filogenéticos para el estudio taxonómico a nivel de especie, aunque también puede ser utilizada para el estudio de grupos taxonómicos superiores debido a que su secuencia de aminoácidos está altamente conservada [57, 84, 86, 88, 117].

1.6 Infecciones causadas por el complejo *Scedosporium apiospermum*

En los últimos años el complejo ha adquirido especial relevancia como agente causal de infecciones oportunistas, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, y se asocia a una mortalidad elevada debido a la resistencia intrínseca a los tratamientos antifúngicos convencionales [21, 89, 90]. Las infecciones causadas por *P. boydii* comprenden un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Tabla 2) donde a menudo reciben el nombre genérico de “scedosporiosis” ya que en muchos casos solo se aísla *S. apiospermum*. Sin embargo, el término scedosporiosis también incluye a infecciones causadas por otra especie, *Scedosporium prolificans* (hoy en día *Lomentospora prolificans*). Ambas especies son patógenos oportunistas causantes de infecciones graves y de difícil tratamiento. *P. boydii* se encuentra en pacientes con fibrosis quística con una frecuencia del 8.6%, lo cual lo ubica como el segundo hongo más común en pulmones después de *Aspergillus* spp. [21, 91].

Las infecciones por *P. boydii* suelen adquirirse por traumatismo o herida penetrante, frecuentemente tras la contaminación con suelo o estiércol. También puede ocurrir en infecciones de heridas quirúrgicas, inmersión accidental en aguas contaminadas, pacientes con neutropenia e inmunosupresión celular, pacientes que van a recibir un trasplante, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pacientes con tratamiento de corticoides, etc. Las manifestaciones clínicas que causa *P. boydii* se pueden agrupar en tres síndromes: a) enfermedad localizada la cual puede darse en personas sanas, b) colonización asintomática o sintomática de cavidades, las cuales se observan en pacientes

con predisposición a desórdenes pulmonares y c) enfermedad sistémica invasiva se presenta principalmente en pacientes inmunosuprimidos [21, 90, 117]. Las diferentes manifestaciones de estos tres síndromes, se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Espectro clínico de la scedosporiosis (Gilgado y *col*, 2007).

| Cuadro clínico | Manifestaciones |
|---------------------|--|
| Localizado | Eumicetoma Artritis Osteomielitis Infecciones oculares Onicomycosis Infecciones linfocutáneas |
| Colonización | Sinusitis Otitis Bola fúngica pulmonar Alergia broncopulmonar Colonización pulmonar en fibrosis quística |
| Sistémico | Infección invasiva pulmonar Endocarditis Infección diseminada Infecciones por <i>P. boydii</i> en pacientes de SIDA Infecciones en el SNC Near-drowning |

A nivel mundial la incidencia de las infecciones por *Scedosporium* spp., no se ha podido determinar con exactitud, sin embargo existen algunos estudios donde se ha reportado una alta frecuencia de las infecciones causadas por *Scedosporium* spp y *L. prolificans*. En un estudio realizado en Australia en 2009

a partir de 118 casos de scedosporiosis se observó la colonización en el 65.5% e infección en el 34.4% de los pacientes, y se asociaron factores de riesgo como: enfermedad pulmonar crónica (37.8%), malignidades hematológicas (21.7%); así como factores predictores para desarrollar una enfermedad invasiva en pacientes con infección como: leucemia, diabetes *mellitus*, trasplante de médula ósea. Se aisló a *L. prolificans* (41%) y a especies del complejo de *Scedosporium* (59%) de los casos. *S. aurantiacum* tuvo una prevalencia >15.8% al igual que *S. apiospermum* [92].

Por otra parte Rodríguez-Tudela reportó en el mismo año una revisión de 162 casos con infecciones por *L. prolificans*, la media de edad de los pacientes fue de 45 años y 102 (63%) fueron hombres, los factores de riesgo asociados a estos casos fueron: malignidades (45.7%), fibrosis quística (11.7%), trasplante de órganos (8.6%). La presentación clínica con mayor prevalencia fue la infección diseminada (44.4%), posteriormente la micosis pulmonar (29%) y finalmente la infección en articulaciones y hueso con una prevalencia del 10.4%. Se observó una mortalidad mayor al 87% en infecciones diseminadas. Además el tratamiento antifúngico no disminuyó el riesgo de muerte debido a la alta resistencia a los antifúngicos convencionales [93].

Se puede clasificar las infecciones causadas por estos hongos de acuerdo al estado inmunológico del paciente, aquellos pacientes inmunocomprometidos presentan las patologías más graves, dentro de las cuales se encuentra la colonización pulmonar primaria la cual suele confundirse fácilmente con un aspergiloma, lo que con lleva una falla terapéutica y la subsecuente

diseminación provocando una scedosporiosis invasiva pulmonar, tal como lo demuestra Lackner y *col.*, en un estudio realizado en España en el 2011 en pacientes con fibrosis quística e inmunocomprometidos, ellos reportaron a *L. prolificans* como el agente causal con mayor prevalencia en tracto respiratorio de estos pacientes seguido de *P. boydii*, *P. apiosperma* y *P. ellipsoidea* [93].

Actualmente las infecciones causadas por estos microorganismos han cobrado cada vez mayor importancia ya que hoy en día se reportan un mayor número de casos de infecciones graves no solo asociadas a pacientes inmunocomprometidos sino a pacientes inmunocompetentes desarrollando infecciones diseminadas.

Los mayores problemas para resolver en estas infecciones son: (1) el agente causal es de difícil diagnóstico, en la fase infectiva presenta una morfología y ramificación de hifas en tejido similar a la de *Aspergillus*, con la que es habitualmente confundido, (2) aunque se llegue a diagnosticar la infección, los tratamientos terapéuticos habituales son inadecuados, y (3) el conocimiento de su potencial clínico, su virulencia y sus rutas de transmisión e infección son pobremente conocidas.

1.7 Estudios de sensibilidad antifúngica

Los estudios de sensibilidad antifúngica permiten valorar la sensibilidad *in vitro* de un hongo a uno o más antifúngicos, correlacionar la actividad de los

fármacos en estudios *in vivo* y predecir el pronóstico terapéutico. Son útiles también para detectar el desarrollo de cepas resistentes y determinar el potencial valor terapéutico de un nuevo agente antifúngico [94]. Es por ello sumamente importante su estudio en las especies fúngicas que sean patógenas u oportunistas.

1.7.1 Susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos

Los métodos y técnicas de estudio de la sensibilidad *in vitro* de los hongos a los antifúngicos son similares a los de los antibacterianos, sin embargo, en el caso de los hongos filamentosos se presentan dificultades con estos métodos debido a determinados factores lo que conlleva una difícil evaluación de las pruebas *in vitro*. Entre ellos podemos citar su lento crecimiento, lo cual se traduce en periodos de incubación más largos provocando la pérdida de actividad de los antifúngicos, y la baja incidencia de las infecciones fúngicas haciendo que la definición de los puntos de corte sea difícil de establecer.

En 1982 el Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (anteriormente, National Comite for Clinical Laboratory Standards NCCLS) creó un subcomité con el objeto de establecer una normativa para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos. El primer objetivo fue unificar los criterios metodológicos, primero para las levaduras y posteriormente para los hongos filamentosos, con el fin de establecer correlaciones entre los resultados obtenidos en el laboratorio y en clínica. Tras la revisión de diversas publicaciones, en el 2002 el CLSI publicó el

documento M38-A (NCCLS, 2002b) para los hongos filamentosos y posteriormente en el 2008 aparece el M38-A2 con actualizaciones que permiten incluir a otros hongos filamentosos como los dermatofitos. Este documento propone un método de microdilución y macrodilución en medio líquido y establece las variables experimentales críticas para los ensayos *in vitro*. Desde el inicio de su utilización, estos protocolos han sido aceptados universalmente como el método de referencia para el ensayo de la susceptibilidad *in vitro* de los compuestos antifúngicos tanto frente a levaduras como para hongos filamentosos.

1.7.2 Sensibilidad *in vitro* del complejo *Scedosporium* a los antifúngicos

La mayoría de trabajos publicados sobre la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos de *P. boydii* han demostrado una pobre eficacia de la mayoría de éstos frente a dicha especie. Así, antifúngicos como la anfotericina B (AMB), nistanina, nistatina liposomal, itraconazol (ITC), 5-flucitosina (FCT), fluconazol (FLC), terbinafina (TBF) y ketoconazol (KTC) han mostrado ser ineficaces para la mayoría de cepas ensayadas [96, 97, 117]. Varios estudios han mostrado CMI (concentración mínima inhibitoria) para estos fármacos que pueden indicar resistencia. Sin embargo, los nuevos triazoles han mostrado tener una buena actividad *in vitro*. Carrillo y *col.*, en el 2001 reportaron CMI₉₀ de 0.25 µg/mL para el voriconazol (VRC), el ravuconazol (RAVU) mostró 0.125 µg/mL y el posaconazol (POS) de 0.25 µg/mL; por otra parte Meletiadis y *col.*, en el 2002

reporta 0.5 µg/mL para el VRC y de 2 µg/mL para el POS. En el 2005 González y col., en un estudio realizado a 28 cepas de *P. boydii* en México reportan una CMI₉₀ de 4 µg/mL para RAVU e ITC y de 2 µg/mL para VRC y POS respectivamente. Sin embargo, para el 2006 Gilgado y col., realizaron un estudio de susceptibilidad *in vitro* de 84 aislamientos del complejo *Scedosporium* frente a AMB, FLC, ITC, VRC, RAVU, POS, albaconazol (ABC), micafungina (MICA), terbinafina (TBF) y KTC, y encontraron una amplia diferencia en las susceptibilidades entre las diferentes especies, *S. aurantiacum* fue la más resistente a los fármacos y de manera general el VRC con un rango de CMI (0.12 -1 µg/mL) fue el antifúngico con mejor actividad seguido del POS con un rango de 0.5 – 2 µg/mL [96, 98 - 100].

Por otra parte, recientemente Lackner y col., en el 2012 realizaron un estudio de 332 aislamientos clínicos y ambientales de especies de *Scedosporium/Pseudallescheria* frente a ocho antifúngicos (AMB, anidulafungina (ANI), caspofungina (CAS), micafungina (MICA), isavuconazol (ISA), POS, VRC e ITC reportando la media geométrica de CMI y CME (concentración mínima efectiva) para *P. apiosperma* de 0.9, 2.4, 7.4, 16.2, 0.2, 0.8, 1.5, y 6.8 µg/mL para VRC, POS, ISA, ITC, MICA, ANI, CAS y AMB respectivamente y para *P. boydii* de 0.7, 1.3, 5.7, 13.8, 0.5, 1.4, 2.3 y 11.8 µg/mL para VRC, POS, ISA, ITC, MICA, ANI, CAS y AMB respectivamente. El VRC presentó mejor actividad antifúngica frente a los aislamientos de *S. aurantiacum*, y la droga con el valor más bajo de CMI₉₀ de ≤2 µg/mL para *P. apiosperma* y *P.*

boydii. La MICA y el POS presentaron una actividad moderada frente a los aislamientos de *Scedosporium* spp [96, 101].

Considerando esta pobre actividad de los diferentes antifúngicos *in vitro*, algunos investigadores han intentado determinar la actividad combinando algunos fármacos. Walsh y *col.*, en 1995 determinaron la actividad antifúngica *in vitro* de la AMB sola y combinada con varios azoles. Demostraron que algunas cepas eran sensibles a la AMB y que las combinaciones ensayadas mostraban una interacción sinérgica frente a un amplio número de aislados, no se detectó antagonismo en ningún caso. La combinación AMB/FLC mostró los mejores resultados (índice de concentración inhibitoria fraccional = 0.61), aunque en la actualidad los valores indicativos de sinergia deben ser inferiores a 0.5 (Johnson y *col.*, 2004). Por otra parte la combinación de AMB/MICA ha mostrado un buen sinergismo aunque el mecanismo de este efecto no está del todo claro, se cree que la MICA al inhibir la síntesis de (1,3)- β -D-glucano lo que conlleva a interferir en la síntesis de la pared celular provocando daños estructurales lo que facilita la acción de la AMB en la membrana celular a bajas concentraciones [101, 117].

Por lo anterior hoy en día existe la necesidad de obtener nuevas terapias antifúngicas para el tratamiento de las infecciones causadas por estos hongos e incluso intensivar los ensayos en terapias combinadas que logren obtener mejores resultados y se puedan extrapolar en el tratamiento de las infecciones causadas por estos microorganismos.

1.7.3 Tratamiento de las infecciones por el complejo *Scedosporium*

Se ha puesto de manifiesto anteriormente que las infecciones invasivas provocadas por las especies del complejo *Scedosporium* son difíciles de tratar debido a la resistencia de estas especies a una gran variedad de antifúngicos entre los que se encuentran el FLC y la AMB [100- 102]. El tratamiento de elección para las infecciones producidas por este hongo aún no ha sido bien establecido debido al difícil diagnóstico y la variabilidad que presentan en las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. La cirugía se utilizó en algunos casos y terapias antifúngicas con triazoles han sido eficaces en muchos casos.

Scedosporium apiospermum y *L. prolificans* afectan a pacientes inmunodeprimidos, y causan aproximadamente el 25% de las infecciones producidas por hongos filamentosos distintos de *Aspergillus* en receptores de trasplante de órganos, se encuentran entre las micosis de más difícil tratamiento dado la frecuencia de diseminación de la infección, la inmunosupresión de los pacientes y la resistencia a los antifúngicos expresada especialmente por *L. prolificans*. La respuesta global positiva al VRC de las infecciones por *Scedosporium* se encuentra alrededor del 30%. El estudio por especie demuestra que esta tasa se eleva al 63% en las infecciones por *S. apiospermum* mientras el 29% son causadas por *L. prolificans*, concordando con los estudios de susceptibilidad *in vitro* donde demuestran una mayor actividad del VRC, respecto a otros azoles. Estos datos se pueden confirmar en pacientes con trasplante de órganos en los que se obtuvo una tasa global de supervivencia

significativamente superior de los tratados con VRC, con respecto a los tratados con AMB o ITC [103].

En la casuística de Díaz-Pedroche y *col.*, en los cinco pacientes infectados por *S. apiospermum*, la terapia con VRC dio lugar a una respuesta favorable completa en tres de ellos y parcial en los otros dos, mientras que fracasó en el único paciente infectado por *L. prolificans*. En infecciones causadas por *S. apiospermum*, en varios casos en los que se ha descrito la eficacia clínica del VRC en el tratamiento de infecciones diseminadas y localizadas, destacando las infecciones del sistema nervioso central (SNC) y las oculares [103].

El POS ha mostrado ser activo *in vitro* frente a *P. boydii*, lo que concuerda con la actividad mostrada *in vivo* en un modelo animal, siendo incluso más eficaz que el ITC [104]. Existe todavía muy poca experiencia clínica con el POS, pero se puede destacar un caso de un paciente con múltiples abscesos cerebrales por *P. boydii* que fue tratado previamente y sin éxito con ITC, AMB y KTC y que curó después de tratarlo con POS [105].

1.8 Estudios *in vivo* en modelos animales de scedosporiosis sistémica

Existen pocos estudios en modelos animales que permitan conocer a fondo la patogenicidad, virulencia, respuesta inmune e interacción celular de las especies del complejo del *Scedosporium*; sin embargo desde hace más de diez años se han implementado modelos animales para el estudio de la

scedosporiosis sistémica principalmente modelos murinos. En el 2002 González y *col.*, desarrollaron un modelo murino de scedosporiosis sistémica en ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos, utilizando inóculos de 1×10^3 UFC/mL a 5×10^6 UFC/mL, correlacionan la mortalidad con la concentración de inóculos y la inmunosupresión; en los ratones inmunocompetentes se estableció una infección sistémica que afecta a una gran variedad de órganos como el hígado, bazo y cerebro y prevalece en este último a diferencia de los ratones inmunodeprimidos en los que persiste la infección en la mayoría de los órganos con una mortalidad elevada [106].

Ortoneda y *col.*, por otra parte realizaron una comparación en la virulencia de cepas de *L. prolificans* de diferentes orígenes (infección diseminada, fibrosis quística asintomática y ambientales), y dos cepas de *S. apiospermum* en un modelo murino de infección sistémica, no observaron una diferencia significativa entre las cepas con distintos orígenes pero si establecen claramente que las cepas de *L. prolificans* son más virulentas que las de *S. apiospermum* ya que provocaron la muerte del 100% de los ratones inmunocompetentes a las 2 semanas [107].

Por otra parte para el 2009 con los trabajos publicados por Gilgado y *col.*, estableciendo que *P. boydii* era un complejo de especies distintas estos autores realizaron un estudio de virulencia en un modelo murino de scedosporiosis sistémica con ratones inmunocompetentes donde evaluaron dos cepas de cada una de las especies encontradas (*S. boydii* sensu estricto, *S. minutisporum*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*), utilizaron un inóculo de $5 \times$

10^4 UFC/mL en ratones inmunosuprimidos y de 1×10^6 UFC/mL en ratones inmunocompetentes respectivamente. *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* fueron las cepas más virulentas y causan la muerte del 80% y 70% de los ratones inmunocompetentes respectivamente, el resto de las especies solo causó del 0 – 20% de muerte [108].

En base a los reportes de la alta tasa de mortalidad por infecciones diseminadas causadas por *L. prolificans* y los estudios recientes en los se aisló *S. aurantiacum* en esta misma patología surge la inquietud de determinar la virulencia de estas dos especies, para ello en el 2010 Harun y *col.*, realizaron un estudio en un modelo murino de infección sistémica con un inóculo de 2×10^5 UFC/mL, determinando que no existió diferencia significativa entre *S. aurantiacum* y *L. prolificans* y provocan la muerte del 60 – 100% de los animales [109].

Los modelos animales en el estudio de las infecciones fúngicas han sido de gran relevancia ya que han permitido conocer los mecanismo de patogenicidad, respuesta inmune y la eficacia terapéutica frente una gran variedad de hongos donde las especies del complejo *Scedosporium* no son la excepción ya que se han utilizado una amplia variedad de animales como los ratones (distintas cepas), conejos, entre otros. Los modelos murinos han sido los más utilizados debido a su bajo costo y fácil manejo. En estudios de eficacia terapéutica estos han sido de gran utilizad ya que los resultados obtenidos en dichos estudios pueden ayudar a predecir el comportamiento de un antifúngico en una infección determinada [110, 111].

1.9 OBJETIVOS

1.9.1. Objetivo general

Aislar y caracterizar muestras clínicas y ambientales del complejo *Pseudallescheria boydii* por medio de estudios fenotípicos y moleculares.

1.9.2. Objetivos específicos

- 1.- Aislar e identificar morfológicamente las especies del complejo *P. boydii* a partir de muestras de suelo de distintos estados de República Mexicana.
- 2.- Determinar la concentración de nitrógeno total y pH del suelo donde se obtengan las muestras ambientales.
- 3.- Caracterizar a nivel de especie mediante métodos moleculares los aislamientos clínicos y ambientales.
- 4.- Caracterizar fenotípicamente los aislamientos clínicos y ambientales identificados previamente como *P. boydii*/*Scedosporium* spp.
- 5.- Determinar la virulencia de las especies encontradas en nuestro país mediante un estudio de carga fúngica en un modelo murino de scedosporiosis sistémica.
- 6.- Determinar la correlación de los datos epidemiológicos y moleculares entre las especies del complejo *P. boydii* encontradas en nuestro país.

JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial la scedosporiosis es una micosis emergente con un amplio espectro de manifestaciones clínicas y de difícil tratamiento, cuya incidencia es cada vez mayor en pacientes inmunocomprometidos. Recientemente con base en hallazgos moleculares, se demostró que *P. boydii* es un complejo, por lo que es importante llegar a una identificación precisa de sus especies.

Existe poca información acerca de este microorganismo y en México, no hay reportes de la ecología, virulencia y distribución de las especies que conforman el complejo *Scedosporium*, motivo por el cual surge la necesidad de estudiar el comportamiento epidemiológico de las mismas en nuestro país.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general

En la figura 7 se muestra la estrategia general que se siguió para cumplir con los 6 objetivos específicos planteados para llevar a cabo este estudio. Se recolectaron 101 muestras ambientales de suelo de distintas áreas y regiones geográficas de México, además se recolectaron los datos clínicos y epidemiológicos de 17 muestras de pacientes con diagnóstico mediante cultivo de Scedosporiosis las cuales fueron recolectadas en un período de 13 años (2000 - 2013) en el Centro Regional de Enfermedades infecciosas (CREI) del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, UANL., del estado de Nuevo León. A todos los aislamientos clínicos y ambientales se les realizó identificación microbiológica mediante la observación macroscópica y microscópica, pruebas fisiológicas, enzimáticas y la identificación molecular para obtener la identificación definitiva mediante secuenciación de una región parcial del ITS del ADNr. Posteriormente se llevó a cabo la determinación del pH y nitrógeno total de las muestras de suelo positivas. Se llevó a cabo el estudio de susceptibilidad *in vitro* a diferentes antifúngicos. Por otro lado, partiendo de la identificación molecular se realizó el estudio de carga fúngica e histopatología en

un modelo murino de scedosporiosis sistémica. Por último se siguió con el análisis estadístico para establecer posibles correlaciones entre los hallazgos fenotípicos y genotípicos con las características ambientales, geográficas y epidemiológicas de las especies obtenidas.

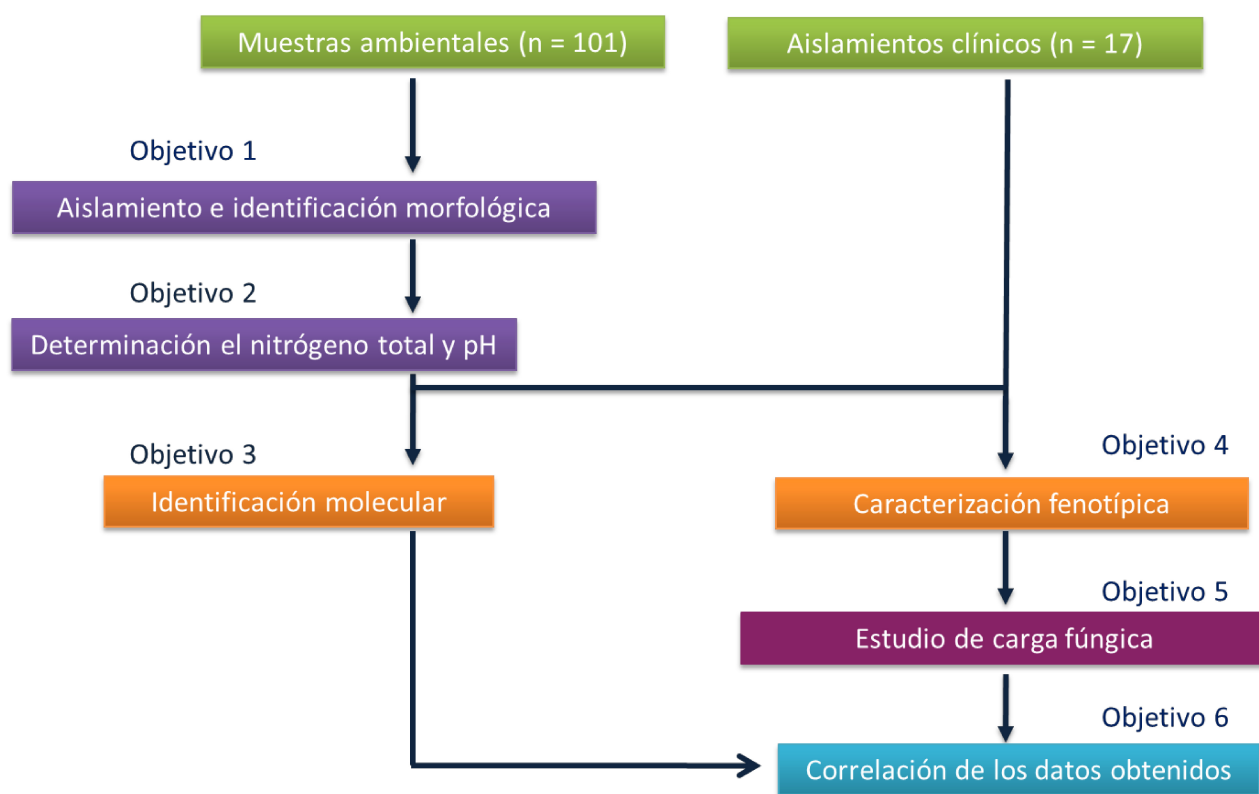


Figura 7. Esquema de la estrategia general seguida para la identificación fenotípica y molecular de aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* en México.

2.2 Cepas clínicas

Se obtuvieron 17 aislamientos clínicos de *Scedosporium* spp./*Pseudallescheria* spp., recolectadas en un período de 13 años (2000 – 2013) los cuales se aislaron en el laboratorio de Micología del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas. Los aislamientos se realizaron en agar dextrosa Sabouraud o agar papa dextrosa (APD), fueron incubados a 30°C por 4 días. Se realizaron pruebas de morfología microscópicas para la observación de las características típicas del complejo *P. boydii*. Las cepas se mantuvieron en suspensión con agua destilada estéril a temperatura ambiente hasta que los ensayos se llevaron a cabo.

2.3 Cepas ambientales

Todas las cepas ambientales estudiadas fueron aisladas a partir de 101 muestras de suelo recolectadas durante un periodo de 2 años, donde se obtuvieron de 1 a 5 muestras de suelo de 26 estados de México de diferentes áreas con alta actividad humana como: jardín de casa, jardín urbano, parque industrial y deportivo y lodos de plantas tratadoras de agua (Tabla 3).

Tabla 3. 101 muestras ambientales recolectadas de 26 estados de México.

| Lista de estados muestreados (~ 1 a 5 muestras/estado) | |
|--|-----------------------|
| ✓ Chihuahua | ✓ Baja California Sur |
| ✓ Puebla | ✓ Quintana Roo |
| ✓ Morelos | ✓ Yucatán |
| ✓ Edo. de México | ✓ Hidalgo |
| ✓ Distrito federal | ✓ Guanajuato |
| ✓ San Luis Potosí | ✓ Durango |
| ✓ Tamaulipas | ✓ Tabasco |
| ✓ Coahuila | ✓ Jalisco |
| ✓ Nuevo León | ✓ Zacatecas |
| ✓ Guerrero | ✓ Veracruz |
| ✓ Campeche | ✓ Oaxaca |
| ✓ Sonora | ✓ Sinaloa |
| ✓ Aguascalientes | |
| ✓ Baja California | |

2.3.1 Activación de suelos, aislamiento y obtención de cultivos puros

Las muestras de suelo fueron recolectadas de los estratos superficiales, para ello se utilizaron bolsas de polietileno estériles. Un gramo de este material se suspendió en 10 mL de agua estéril (dilución 1:10) y 1 mL de esta suspensión se depositó en el medio selectivo Agar Diclorán Rosa-Bengala Cloranfenicol (ADRB) (Difco) con benomilo añadido a una concentración final de 10 µg/mL (Benomyl, Sigma Aldrich) y se incubaron a una temperatura de 30°C. Los cultivos se observaron regularmente durante los primeros 3 días hasta detectar crecimiento fúngico.

A partir de las colonias que presentaron la morfología propia de *P. boydii* (Figura 8), se realizaron montajes en azul de lactofenol para su observación microscópica. Si la observación de las estructuras fúngicas correspondía a una

posible *P. boydii*/*Scedosporium* se procedió a su aislamiento en cultivo puro en medio APD.



Figura 8. Cultivo obtenido a partir de una muestra de suelo en medio ADRB con benomilo, mostrando colonias típicas de *P. boydii* (señaladas con flechas).

2.4 Determinación de pH y nitrógeno total de muestras de suelo

Se determinó el pH de las muestras de suelo positivas para *P. boydii*/*Scedosporium*, para lo cual se pesaron 5 gr, se mezcló y tamizó, se añadieron 12.5 mL de una solución de cloruro de calcio al 0.01 M, se dejó reposar por 24 horas a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se llevó a cabo la lectura del pH en un potenciómetro (Ultra Basic Benchtop Meters, Denver Instrument). La determinación de nitrógeno total del suelo se llevó a cabo en el laboratorio de servicios profesionales de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

2.5 Identificación molecular

2.5.1 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico, partiendo del micelio del hongo, crecido en APD durante 7 días a 30°C, se transfirió aproximadamente 1cm² de micelio a un tubo eppendorf de 2 mL, se agregó 200µL de buffer de lisis (Tris-HCl pH 8 20mM, EDTA 2mM, 1.2% triton x-100), se añadió lisozima y quitinasa a una concentración de 2 mg/mL respectivamente, se mezcló e incubó por 4 horas a 37° C. Posteriormente se agregaron 390 µL de TE 1X con SDS al 10% más 4 µL de proteinasa K (2mg/mL) y se incubó por 1 hora a 55°C. Se agregaron 100 µL de NaCl 5M y se mezcló, luego se agregaron 80 µL de cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB), se mezcló e incubó por 1 hr a 65°C. Posteriormente se agregó un volumen igual de cloroformo-alcohol-isoamílico (24:1) y fenol saturado (250 µL) y 100 µL TE 1X. Se mezcló y se centrifugó a 14 000 Xg por 8 min, se separó la fase acuosa. Se repitió el paso anterior. A la fase acuosa final se agregaron 0.6 volumen de alcohol-isopropílico y 80 µL de acetato de sodio al 3M y un pH 5.2 ± 1, posteriormente se incubó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 14 000 Xg por 8 min. Se desechó el sobrenadante y la pastilla que quedó, se lavó con un 1mL de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó a 14000 Xg por 8 min. Se desechó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió en 50 µL de TE 1X y se calentó a 65° C por 15 min. Para finalizar el ADN, se cuantificó por

espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Se almacenó a -20°C hasta su utilización.

2.5.2 Amplificación de la región ITS y el gen 5.8S del ADNr

Para la amplificación de la región ITS completa (ITS1-5.8S-ITS2), se utilizaron los iniciadores ITS5 e ITS4 (ver Tabla 4) [77]. La mezcla de reacción para PCR fue con un volumen final de 50 µL, contenía ~30 ng de ADN templado, 1X de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, Madison, WI) y 0.2 µM de cada primer. El programa de amplificación incluyó un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 4 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 30 segundos, y extensión a 72°C por 30 segundos, además de un paso final de extensión a 72°C por 3 min.

Tabla 4. Iniciadores utilizados para la PCR y secuenciación

| Iniciador | Locus | Secuencia 5' a 3' | Referencia |
|-----------|----------|-----------------------|----------------------------|
| ITS5 | ITS ADNr | GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG | White y <i>col.</i> (1990) |
| ITS4 | ITS ADNr | TCCTCCGCTTATTGATATGC | White y <i>col.</i> (1990) |

2.5.3 Purificación de los productos amplificados

Posterior a la PCR, los productos fueron purificados con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI) bajo los lineamientos del fabricante y fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

2.5.4 Secuenciación de los productos de la PCR

La reacción de secuenciación fue realizada utilizando el kit de secuenciación BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EU) de acuerdo con el protocolo del fabricante, las reacciones fueron corridas y analizadas en el equipo Avant 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Termociclador Px2 Thermal cycler (Termo Electro Corporation Milford, MA, EU). Los productos amplificados de la reacción de secuenciación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y revelados con luz UV (UVP BioImaging System. EpiChemi 3 Darkroom). Para comprobar el tamaño de las amplificaciones se utilizó un marcador de peso molecular de 1000 pb HyperLadder IV (Bioline, MA, EU).

La secuenciación se realizó en la Unidad Académica de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.

2.5.5 Alineamiento y análisis de las secuencias nucleotídicas

Las secuencias consenso fueron obtenidas utilizando el software GeneStudio TM Professional Edition Versión 2.2.0.0. (GeneStudio, Inc.), las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias consenso del ITS de *Scedosporium* spp./*Pseudallescheria* spp., reportadas utilizando la herramienta de alineamiento BLAST del sitio National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias alineadas fueron comparadas con base a la similitud con los datos disponibles en el GenBank.

2.5.6 Depósito de secuencias en el GenBank

Todas las secuencias obtenidas fueron depositadas en la base de datos del GenBank a través de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov .

2.6 Estudios fenotípicos

2.6.1 Características morfológicas

2.6.1.1 Macroscópicas

La caracterización macroscópica de las colonias se llevó a cabo en el medio de cultivo APD. Todos los aislamientos se incubaron a diferentes temperaturas (30, 37, 40 y 45°C en oscuridad), donde se observaron las características macroscópicas de las mismas a los 7 y 14 días posteriores a su inoculación, determinando los siguientes parámetros:

- Diámetro
- Color (anverso)
- Textura (algodonosa, pulverulenta, granulosa, aterciopelada, etc.)
- Márgenes (definidos, irregulares, etc.)
- Pigmento difusible (ausencia, presencia y color)
- Gotas de exudado (ausencia, presencia)

2.6.1.2 Microscópicas

La caracterización microscópica de los aislamientos se llevó a cabo mediante la técnica de micro cultivo en APD a 30°C durante 7 días. Los parámetros microscópicos que se llevaron a cabo fue la medición de las estructuras fúngicas de reproducción sexual y asexual (conidios, cleistotecios y coremios). Se hizo el análisis morfométrico en el microscopio Nikon eclipse 50i, con cámara digital DS-2Mv obteniendo la medida de cada una de las estructuras antes mencionadas. Se realizó la documentación gráfica mediante tomas con los objetivos de 40 x y 100 x de cada una de las estructuras.

2.7 Estudios fisiológicos y enzimáticos

2.7.1 Pruebas de asimilación de carbohidratos

Se realizaron un total de 5 pruebas fisiológicas, la asimilación de carbohidratos probadas fueron: D-ribosa, L-arabinosa, sacarosa, maltosa y lactosa. También se realizaron pruebas de termotolerancia a 30, 37, 40 y 45°C.

El inóculo se preparó raspando la colonia fúngica, después de 7 días de crecimiento en APD, suspendiendo el micelio en solución salina estéril. La suspensión fúngica se agitó en vortex durante 15 segundos y se filtró a través de una gasa estéril, con el objetivo de eliminar las hifas y obtener una suspensión

exclusivamente de conidios. La concentración de la suspensión de conidios fue ajustada en una cámara de Neubauer a 10^5 conidios/mL. Se realizó una dilución seriada en solución salina y se verificó la viabilidad de los conidios sembrando 100 μ L e incubando posteriormente a 30°C. El crecimiento y la capacidad de asimilación fueron probados en medio líquido siguiendo el protocolo descrito por Yarrow (1998). Se dispensó un volumen de 100 μ L de cada uno de los inóculos en los tubos con los diferentes sustratos se incubó en oscuridad a temperatura de 25°C por 14 días, posteriormente se realizó la lectura determinada por la presencia o ausencia de crecimiento.

2.7.2 Pruebas de actividad enzimática

Se realizaron pruebas de actividad enzimática: hidrólisis de la urea, licuefacción de la gelatina, producción de actividad proteasa y fosfolipasa. La hidrólisis de la urea fue probada usando el agar urea Christensen (BBLTM), incubando a 25°C durante 4 días, y el resultado se consideró positivo si el medio viraba a rosa. La licuefacción de la gelatina se probó en un medio compuesto por 100 g gelatina, 5 g glucosa, 6.7 g de medio de nitrógeno base y 1 L de agua destilada e incubado a 21°C durante 3 semanas. Las lecturas fueron realizadas después de 2 hr de incubación a 4°C (Yarrow, 1998). Las pruebas de actividad proteasa y fosfolipasa se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito por Treviño-Rangel y *col.*, con ligeras modificaciones ya que estos estudios se realizaron de manera cualitativa y no semi-cuantitativa como marca el protocolo

establecido para levaduras [113]. Para los estudios de termo tolerancia los aislados fueron cultivados en APD e incubados en oscuridad durante 14 días y posteriormente se realizaron las mediciones del diámetro de las colonias a los 7 y 14 días.

2.8 Estudios de susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos

2.8.1 Método de microdilución

Se realizaron los estudios de susceptibilidad *in vitro* siguiendo el método de referencia M38-A2 del CLSI [114].

2.8.2 Agentes antifúngicos

Los agentes antifúngicos utilizados fueron proporcionados por sus respectivas compañías farmacéuticas, (ver tabla 5). Todos los antifúngicos empleados se obtuvieron como sustancias puras y fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1%, excepto anfotericina B la cual se disolvió en agua. Se prepararon diluciones seriadas de cada antifúngico y se dispensó 0.1 mL en cada pocillo de la placa de 96 pozos. Las placas con los diferentes antifúngicos se guardaron a -70°C hasta su utilización.

Tabla 5. Antifúngicos utilizados, rango de concentraciones utilizadas y compañías farmacéuticas.

| Antifúngico | Rango de concentraciones | Compañía farmacéutica |
|----------------------|--------------------------|--|
| Anfotericina B (AMB) | 0.03 – 16 µg/mL | Bristol Myers Squibb. (Princeton, NJ, USA) |
| Posaconazol (POS) | 0.03 – 16 µg/mL | Shering-Plough. (Kenilworth, NJ, USA) |
| Voriconazol (VRC) | 0.03 – 16 µg/mL | Pfizer, Inc. (New York, NY, USA) |
| Caspofungina (CAS) | 0.015 – 8 µg/mL | Merck Sharp & Dohme (Haarlem, Netherlands) |
| Anidulafungina (ANI) | 0.015 – 8 µg/mL | Pfizer, Inc. (New York, NY, USA) |
| Micafungina (MICA) | 0.015 – 8 µg/mL | Astellas Pharma, Inc. (Ibaraki, Japan) |
| Flucitocina (FCT) | 0.125 – 64 µg/mL | Rising Pharmaceutical, Inc. (Allendale, NJ, USA) |
| Fluconazol (FLC) | 0.125 – 64 µg/mL | Pfizer, Inc. (New York, NY, USA) |

2.8.3 Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo según los lineamientos del documento M38-A2 del CLSI. Se partió de una placa de APD de un cultivo con el crecimiento de 7 días a 30°C. Se adicionaron 5 ml de solución salina estéril a cada placa, se rasparon las colonias con un aplicador de madera estéril, para obtener una suspensión homogénea, la cual se llevó a vortex para separar los conidios de las hifas, luego se filtró en gasa estéril. Se ajustó el inóculo a una absorbancia de 0.15 – 0.17, posteriormente se realizó una dilución 1:50 en medio RPMI-1640 (0.4×10^4 a 5×10^4 UFC/mL), se añadió 0.1 mL de esta suspensión a cada uno de los pocillos de la placa con los fármacos.

2.8.4 Condiciones del micrométodo e interpretación de resultados

La placa se incubó a 37°C, las lecturas se realizaron de forma visual cada 24, 48 y 72 horas con la ayuda de un espejo invertido. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se definió para la anfotericina B y equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina) como la concentración más baja de droga que mostró el 100% de inhibición en el crecimiento y para los azoles y flucitosina la CMI se definió como la concentración más baja de droga que mostró el 80% de inhibición del crecimiento, al compararla con el control libre de droga. Para las equinocandinas se realizaron también lecturas de la concentración mínima efectiva (CME), la cual se define como la concentración más baja que provoque un cambio morfológico en el crecimiento de las hifas. Se utilizaron como cepas control de calidad, *Paecilomyces variotii* MYA-3630 y *Candida albicans* ATCC 66027.

2.8.5 Análisis estadístico

Se determinó la media geométrica (MG), la concentración mínima inhibitoria necesaria para inhibir el 50 y 90% de las cepas (CMI₅₀) y (CMI₉₀), el rango de susceptibilidad de cada droga y fueron calculados usando Microsoft® Office Excel 2007.

2.9 Estudio de carga fúngica y análisis histopatológico en un modelo murino de Scedosporiosis sistémica

Se realizaron estudios piloto con grupos de 10 ratones ICR machos de 4 semanas de edad para una especie de *Scedosporium* y *L. prolificans* para determinar la virulencia de la cepa a distintas concentraciones de inóculos, lo que nos permitió establecer el inóculo más adecuado para poder llevar a cabo el estudio de carga fúngica durante un período de 15 días aproximadamente.

Se seleccionaron dos cepas de cada una de las especies del complejo *Scedosporium* identificadas por métodos moleculares en este estudio (*S. boydii* sensu estricto, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. ellipsoidea*, *P. angusta* y *P. fusoidea*), las cuales presentaban distinta actividad de fosfolipasa (una positiva y otra negativa). Por otro lado se seleccionaron tres asilamientos clínicos identificados como *L. prolificans* con actividad fosfolipasa positiva.

2.9.1 Preparación del inóculo

El inóculo se preparó raspando las colonias fúngicas, después de 7 días de crecimiento en APD, suspendiendo el micelio en solución salina estéril. La suspensión se agitó en vortex durante 15 segundos y se filtró a través de una gasa estéril, con el objetivo de eliminar las hifas y obtener una suspensión exclusivamente de conidios. La concentración de la suspensión de conidios fue ajustada en una cámara de Neubauer a 3×10^4 conidios/mL para las cepas de *L.*

prolificans en el estudio de carga fúngica y de 1×10^5 UFC/mL en el de supervivencia. Por otra parte, se ajustó el inóculo a 5×10^4 UFC/mL para las especies del complejo *Scedosporium* en los estudios de carga fúngica de acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo piloto, posteriormente se realizó una dilución seriada en solución salina y se verificó la viabilidad del inóculo sembrando 100 μ L e incubando posteriormente a 30°C.

2.9.2 Estudio de carga fúngica e histopatología para especies del complejo *Scedosporium*

Se trabajó con grupos de 12 ratones ICR machos de 4 semanas de edad inmunocompetentes por cepa, los cuales fueron infectados el día 0 con 0.2 mL del inóculo vía intravenosa a través de la vena caudal del ratón bajo los lineamientos de asepsia y los criterios de un manejo adecuado de los animales de laboratorio. Posteriormente se sacrificaron 4 ratones por grupo/cepa los días 3, 6 y 15 post-infección a los cuales se les extrajo de manera aséptica el cerebro, bazo y riñones; se separó la mitad del órgano para las pruebas histopatológicas colocando los órganos en 100 mL de formalina al 10% y la otra mitad para la determinación de la carga fúngica mediante el homogenizado de los órganos en 1 mL de solución salina, se realizó una dilución seriada y se sembró en placas de APD a 30°C por duplicado para determinar las UFC/gr de tejido después de 48 y 72 hr de incubación. Los órganos fijados en formalina al 10% y buffer de fosfatos fueron posteriormente incluidos en parafina y se

realizaron cortes de tejido de 5 μm de grosor. Los cortes obtenidos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina para observar el proceso inflamatorio y de Gomori Grocott para observar las estructuras fúngicas.

2.9.3 Estudios de supervivencia, carga fúngica e histopatología para *L. prolificans*

2.9.3.1 Estudio de supervivencia

Se trabajó con grupos de 10 ratones ICR machos de 4 semanas de edad inmunocompetentes por cada cepa, los cuales fueron infectados el día 0 con 0.2 ml del inóculo de 1×10^5 UFC/mL a través de la vena caudal del ratón bajo los lineamientos de asepsia y los criterios de un manejo adecuado de los animales de laboratorio. Posteriormente se monitorearon diariamente durante 30 días llevando a cabo un registro de muerte en cada uno de los grupos.

2.9.3.2 Estudio de carga fúngica e histopatología

Se trabajó con grupos de 12 ratones ICR machos de 4 semanas de edad inmunocompetentes por cepa, los cuales fueron infectados el día 0 con 0.2 mL del inóculo de 5×10^3 UFC/mL en la vena caudal del ratón bajo los lineamientos de asepsia y los criterios de un manejo adecuado de los animales de laboratorio.

Posteriormente se sacrificaron 4 ratones por grupo/cepa los días 4, 7 y 10 post-infección a los cuales se les extrajo de manera aséptica el cerebro, bazo y riñones; de los cuales se separó la mitad del órgano para las pruebas histopatológicas colocando los órganos en 100 mL de formalina al 10% y la otra mitad para la determinación de la carga fúngica mediante el homogenizado de los órganos en 1 mL de solución salina, se realizó una dilución seriada y se sembró en placas de APD a 30°C por duplicado para determinar las UFC/gr de tejido después de 48 y 72 hr de incubación. Los órganos fijados en formalina al 10% y buffer de fosfatos fueron posteriormente incluidos en parafina y se realizaron cortes de tejido de 5 µm de grosor. Los cortes obtenidos fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina para observar el proceso inflamatorio y de Gomori Grocott para observar las estructuras fúngicas.

2.9.4 Correlación de los datos epidemiológicos con los hallazgos fenotípicos y moleculares

Se buscó la posible correlación entre las características moleculares y el área geográfica de los aislamientos, el origen, las características del suelo (pH, nitrógeno total), la actividad enzimática, mediante la prueba de Chi cuadrada. La correlación entre la identificación molecular y las CMI's de los antifúngicos mediante la prueba de Mann-Whitney.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Aislamientos

Se procesaron un total de 101 muestras ambientales de 26 estados de la república mexicana, de cada estado se procesaron de 1 a 5 muestras en promedio (ver Tabla 6). Del total de colonias fúngicas obtenidas se seleccionaron todas aquellas con una morfología de sospecha para especies del complejo *Scedosporium apiospermum* cabe mencionar que aunque una muestra de suelo presentara varias colonias con esta morfología todas se aislaron y purificaron ya que se ha descrito que en el mismo nicho ecológico pueden estar presente una o varias de las especies de este complejo.

Tabla 6. Muestras procesadas y aislamientos.

| Estado | Muestras procesadas (n) | Muestras positivas (n) | Aislamientos | % |
|---------------------|-------------------------|------------------------|--------------|-------------|
| Baja California | 3 | 3 | 20 | 19.3 |
| Baja California Sur | 1 | 1 | 1 | 0.97 |
| Chihuahua | 5 | 2 | 3 | 2.9 |
| Coahuila | 11 | 2 | 7 | 6.8 |
| Nuevo León | 8 | 3 | 12 | 11.6 |
| Tamaulipas | 15 | 2 | 3 | 2.9 |
| Durango | 1 | 1 | 1 | 0.97 |
| Zacatecas | 7 | 2 | 1 | 0.97 |
| San Luis Potosí | 5 | 1 | 3 | 2.9 |
| Jalisco | 2 | 1 | 2 | 1.94 |
| Guanajuato | 1 | 1 | 3 | 2.9 |
| Hidalgo | 3 | 2 | 4 | 3.9 |
| Edo. de México | 4 | 1 | 1 | 0.97 |
| Morelos | 2 | 2 | 7 | 6.8 |
| Distrito Federal | 3 | 1 | 1 | 0.97 |
| Puebla | 2 | 2 | 3 | 2.9 |
| Veracruz | 6 | 2 | 6 | 5.8 |
| Guerrero | 3 | 1 | 2 | 1.9 |
| Oaxaca | 4 | 1 | 3 | 2.9 |
| Tabasco | 1 | 1 | 1 | 0.97 |
| Campeche | 5 | 2 | 8 | 7.8 |
| Yucatán | 1 | 1 | 4 | 3.8 |
| Quintana Roo | 4 | 1 | 5 | 4.8 |
| Aguascalientes | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Sinaloa | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Sonora | 1 | 0 | 0 | 0 |

Como se puede observar el estado de Baja California fue donde se obtuvieron el mayor número de aislamientos 20 (19.3%), seguido del estado de Nuevo León con 12 (11.6%), por otra parte en los estados de Sonora, Sinaloa y Aguascalientes no se logró obtener ninguno aislamiento, sin embargo; no podemos aseverar que en estos estados no estén presentes este tipo de microorganismos ya que el número de muestras de suelo que se procesaron fue

pequeño. No obstante; en otros estados donde se procesó una sola muestra de suelo se obtuvieron resultados positivos.

3.2 Determinación de nitrógeno total y pH

De acuerdo a los reportes se ha descrito que estos hongos son capaces de crecer en presencia de altas concentraciones de nitrógeno y en pH ácidos. Los resultados obtenidos se clasificaron de acuerdo al INEGI donde México es clasificado en 8 zonas geográficas: Noroeste, Noreste, Centro norte, Occidente, Centro sur, Oriente, Suroeste y Sureste (ver Tabla 7).

Podemos observar que los rangos de nitrógeno total van de 0.10 – 0.8% y el pH de 4.8 – 7.65, en las diferentes zonas geográficas, a pesar de ello no se observó una diferencia significativa al compararse las diferentes zonas geográficas con el nitrógeno total ($p > 0.0638$) y el pH ($p > 0.0734$).

Tabla 7. Nitrógeno total y pH de las muestras de suelo positivas.

| Zona Geográfica | Estado | Muestra | Nitrógeno Total | pH |
|------------------------|---------------------|----------------|------------------------|-----------|
| Noroeste | Baja California | M1 | 0.6 | 7.25 |
| | | M2 | 0.4 | 5.6 |
| | | M3 | 0.51 | 5.9 |
| | Baja California Sur | M1 | 0.36 | 7.65 |
| | | M1 | 0.74 | 7 |
| | Chihuahua | M2 | 0.61 | 6.2 |
| | Durango | M1 | 0.36 | 7.6 |
| Noreste | Coahuila | M1 | 0.63 | 7.6 |
| | | M2 | 0.46 | 6.8 |
| | Nuevo León | M1 | 0.74 | 7.4 |
| | | M2 | 0.60 | 6.5 |
| | | M3 | 0.71 | 5.6 |
| | Tamaulipas | M1 | 0.47 | 7.5 |
| | | M2 | 0.51 | 7.2 |
| Centro Norte | Zacatecas | M1 | 0.61 | 7.36 |
| | | M2 | 0.54 | 5.2 |
| | San Luis Potosí | M1 | 0.53 | 7.4 |
| | Guanajuato | M1 | 0.45 | 7.3 |
| Occidente | Jalisco | M1 | 0.49 | 6.23 |
| Centro Sur | Estado de México | M1 | 0.77 | 4.8 |
| | Distrito Federal | M1 | 0.5 | 7.13 |
| | Morelos | M1 | 0.71 | 5.7 |
| | | M2 | 0.46 | 6.6 |
| Oriente | Hidalgo | M1 | 0.39 | 6.27 |
| | | M2 | 0.51 | 7.1 |
| | Puebla | M1 | 0.63 | 5.8 |
| | | M2 | 0.72 | 7.2 |
| | Veracruz | M1 | 0.40 | 7.5 |
| | | M2 | 0.48 | 6.8 |
| Suroeste | Oaxaca | M1 | 0.105 | 7.1 |
| | Guerrero | M1 | 0.52 | 7.3 |
| Sureste | Tabasco | M1 | 0.10 | 7.11 |
| | Campeche | M1 | 0.31 | 7.4 |
| | | M2 | 0.42 | 6.9 |
| | Yucatán | M1 | 0.52 | 7.65 |
| | Quintana Roo | M1 | 0.8 | 5.37 |

3.3 Identificación molecular

Para la identificación molecular se empleó la técnica de secuenciación a partir de la amplificación parcial del gen del ITS del ARNr. Se ejemplifica: el carril M (marcador de peso molecular), 1 (cepa DF-118), 2 (cepa HG-175), 3 (cepa OC-147) y 4 (cepa 97-2242) (ver Figura 9).

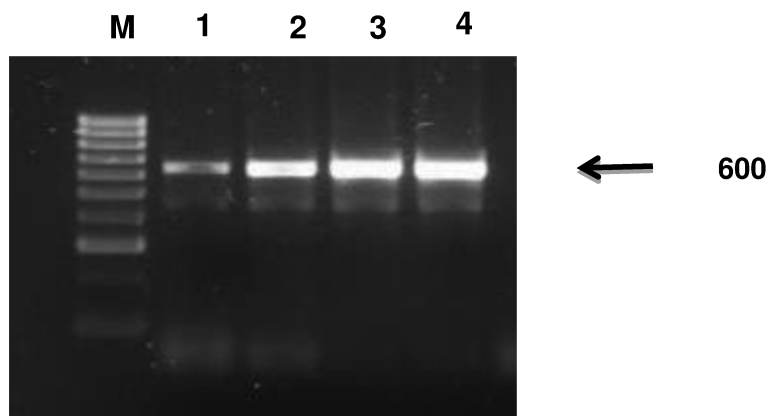


Figura 9. Amplificación parcial del gen de ITS del ARNr (~600pb).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa Gene Studio Versión 2.2.0.0 y comparadas con la base de datos del NCBI (GenBank) donde se identificaron 7 especies del complejo *Scedosporium* a partir de 120 aislamientos clínicos y ambientales, donde *S. boydii* representó la especie más aislada con 36 (30%) del total de los aislamientos seguido de *S. apiospermum* con 26 (22%), por otra parte el resto de las especies representaron desde el 6 – 16% (ver Gráfica1).

Identificación molecular

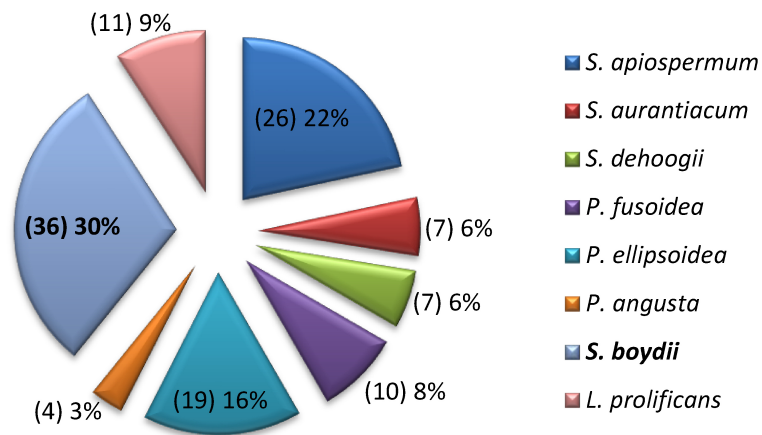


Figura 10. Representación esquemática de la prevalencia de las especies del complejo *Scedosporium*.

Las tablas 8 y 9 muestran los resultados de las identificaciones de los 17 aislamientos clínicos y 103 aislamientos ambientales, realizadas por secuenciación del locus ITS (ITS1-5.8S-ITS2). Se muestra el número de referencia del laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León. El número de acceso del GenBank así como el origen clínico y geográfico de los aislamientos. Los aislamientos identificados fueron 17 de los cuales 11 se identificaron como *L. prolificans*, 2 fueron *S. apiospermum* y 4 *S. boydii*. Los aislamientos ambientales fueron 103, de los cuales 36 correspondieron a *S. boydii*, 26 a *S. apiospermum*, 19 a *P. ellipsoidea*, 10 a *P. fusioidea*, 4 fueron *P. angusta* y 7 *S. aurantiacum* y *S. dehoogii* respectivamente. Todos los aislamientos presentaron una homología $\geq 98\%$ comparado con lo reportado en el GenBank para la identificación definitiva.

Tabla 8. Aislamientos clínicos: número de referencia del laboratorio, número acceso GenBank, especie, origen geográfico y diagnóstico presuntivo.

| No. Referencia | No. acceso GenBank | Identificación molecular | Origen | Estado | Diagnóstico |
|----------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------|-----------------------|
| 10-1167 | KJ176703 | <i>L. prolificans</i> | L. bronquioalveolar | NL | Aspergilosis |
| 09-1125 | KJ176702 | <i>L. prolificans</i> | L. bronquioalveolar | NL | Bola fúngica pulmonar |
| 05-835 | KJ176698 | <i>L. prolificans</i> | Sangre | NL | Infección diseminada |
| 09-2399 | KJ914838 | <i>S. boydii</i> | LCR | NL | Infección diseminada |
| 06-1714 | KJ176696 | <i>L. prolificans</i> | Seno maxilar | NL | Aspergilosis |
| 07-2242 | KJ176704 | <i>L. prolificans</i> | L. bronquioalveolar | NL | I. Invasiva pulmonar |
| 00-320 | KJ914803 | <i>S. apiospermum</i> | Lavado bronquial | NL | Bola fúngica pulmonar |
| 05-1734 | KJ914802 | <i>S. apiospermum</i> | Lavado bronquial | NL | Bola fúngica pulmonar |
| 04-2673 | KJ176697 | <i>L. prolificans</i> | L. bronquioalveolar | NL | Infección diseminada |
| 05-2409 | KJ914837 | <i>S. boydii</i> | Líquido peritoneal | NL | Infección diseminada |
| 05-2190 | KJ176699 | <i>L. prolificans</i> | Lavado peritoneal | NL | Infección diseminada |
| 08-1220 | KJ176700 | <i>L. prolificans</i> | Biopsia de piel | NL | Micetoma |
| 09-98 | KJ914805 | <i>S. boydii</i> | Líquido peritoneal | NL | Infección diseminada |
| 08-1370 | KJ914836 | <i>S. boydii</i> | Lavado bronquial | NL | Aspergilosis |
| 08-2239 | KJ176701 | <i>L. prolificans</i> | LCR | NL | Infección diseminada |
| 12-261 | KJ176705 | <i>L. prolificans</i> | Sangre | NL | Infección diseminada |
| 13-196 | KJ176706 | <i>L. prolificans</i> | L. bronquioalveolar | NL | I. Invasiva pulmonar |

Tabla 9. Aislamientos ambientales: número de referencia del laboratorio, número acceso GenBank, especie, origen del sitio y geográfico.

| No. referencia | No. acceso GenBank | Identificación molecular | Estado | Origen |
|----------------|--------------------|--------------------------|------------------|-------------------|
| 171-HG | KJ1766709 | <i>S. aurantiacum</i> | Hidalgo | Parque deportivo |
| 174-HG | KJ1766710 | | Hidalgo | Jardín urbano |
| 175-HG | KJ1766711 | | Hidalgo | Jardín urbano |
| 176-HG | KJ1766712 | | Hidalgo | Parque industrial |
| 164-GR | KJ1766708 | | Guerrero | Jardín de Casa |
| 118-DF | KJ1766707 | | Distrito Federal | Jardín urbano |
| 070-MC | KJ577993 | | Estado de México | Jardín de Casa |
| 002-NLA | KJ5779985 | <i>S. dehoogii</i> | Nuevo León | Lodo PTA |
| 003-NLA | KJ5779986 | | Nuevo León | Lodo PTA |
| 005-NLA | KJ914777 | | Nuevo León | Lodo PTA |
| 006-NLA | KJ5779987 | | Nuevo León | Lodo PTA |
| 013-NLA | KJ5779988 | | Nuevo León | Lodo PTA |
| 019-NL | KJ914778 | | Nuevo León | Parque industrial |
| 103-NL | KJ5779989 | | Nuevo León | Jardín urbano |
| 007-NL | KJ914801 | <i>S. apiospermum</i> | Nuevo León | Jardín urbano |
| 044-BC | KJ914799 | | Baja California | Parque deportivo |
| 053-BC | KJ914798 | | Baja California | Parque deportivo |
| 075-BC | KJ914792 | | Baja California | Jardín urbano |
| 078-BC | KJ914791 | | Baja California | Jardín urbano |
| 079-BC | KJ914790 | | Baja California | Parque industrial |
| 080-BC | KJ914789 | | Baja California | Parque industrial |
| 082-BC | KJ914788 | | Baja California | Jardín urbano |
| 058-VZ | KJ914797 | | Veracruz | Jardín urbano |
| 060-VZ | KJ914796 | | Veracruz | Parque deportivo |
| 062-VZ | KJ914795 | | Veracruz | Parque deportivo |
| 028-QR | KJ914800 | | Quintana Roo | Jardín urbano |
| 071-PL | KJ914794 | | Puebla | Jardín urbano |
| 072-PL | KJ914793 | | Puebla | Parque industrial |
| 108-GT | KJ914787 | | Guanajuato | Parque industrial |
| 109-GT | KJ914786 | | Guanajuato | Parque industrial |
| 110-GT | KJ914785 | | Guanajuato | Parque industrial |
| 122-MS | KJ914784 | | Morelos | Jardín urbano |
| 125-MS | KJ914783 | | Morelos | Parque industrial |
| 145-TC | KJ914781 | | Tabasco | Parque industrial |
| 148-OC | KJ914780 | | Oaxaca | Jardín urbano |
| 149-OC | KJ914779 | | Oaxaca | Jardín urbano |
| 112-CL | KJ607255 | | Coahuila | Jardín de Casa |
| 127-CH | KJ914782 | | Chihuahua | Jardín urbano |
| 011-NL | KJ914835 | <i>S. boydii</i> | Nuevo León | Jardín urbano |
| 020-NL | KJ914834 | | Nuevo León | Jardín urbano |
| 043-BC | KJ914829 | | Baja California | Jardín urbano |
| 047-BC | KJ914828 | | Baja California | Jardín urbano |
| 048-BC | KJ914827 | | Baja California | Jardín urbano |
| 049-BC | KJ914826 | | Baja California | Parque industrial |

| | | | | |
|--------|----------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| 050-BC | KJ914825 | | Baja California | Parque deportivo |
| 051-BC | KJ914824 | | Baja California | Parque deportivo |
| 074-BC | KJ914819 | | Baja California | Parque deportivo |
| 076-BC | KJ914818 | | Baja California | Parque industrial |
| 077-BC | KJ914839 | | Baja California | Parque industrial |
| 087-BC | KJ914817 | | Baja California | Parque industrial |
| 025-ZS | KJ914833 | | Zacatecas | Jardín urbano |
| 026-QR | KJ914832 | | Quintana Roo | Jardín urbano |
| 029-QR | KJ914831 | | Quintana Roo | Jardín urbano |
| 102-QR | KJ914815 | | Quintana Roo | Jardín urbano |
| 142-GR | KJ914807 | | Guerrero | Jardín de Casa |
| 038-CL | KJ914830 | | Coahuila | Jardín urbano |
| 114-CL | KJ914813 | | Coahuila | Jardín urbano |
| 057-VZ | KJ914823 | | Veracruz | Parque deportivo |
| 061-VZ | KJ914822 | | Veracruz | Jardín urbano |
| 064-VZ | KJ914821 | | Veracruz | Jardín urbano |
| 066-TS | KJ914820 | | Tamaulipas | Jardín urbano |
| 097-YN | KJ914816 | | Yucatán | Jardín de Casa |
| 106-MS | KJ914814 | | Morelos | Jardín urbano |
| 121-MS | KJ914811 | | Morelos | Jardín urbano |
| 124-MS | KJ914810 | | Morelos | Parque industrial |
| 130-SP | KJ914809 | | San Luis Potosí | Jardín urbano |
| 140-BS | KJ914808 | | Baja California Sur | Jardín urbano |
| 162-CC | KJ914806 | | Campeche | Jardín urbano |
| 033-CL | KJ607247 | <i>P. ellipsoidea</i> | Coahuila | Jardín urbano |
| 035-CL | KJ914776 | | Coahuila | Jardín de Casa |
| 153-CC | KJ607248 | | Campeche | Jardín urbano |
| 154-CC | KJ607251 | | Campeche | Parque industrial |
| 159-CC | KJ607252 | | Campeche | Parque industrial |
| 160-CC | KJ607250 | | Campeche | Parque industrial |
| 161-CC | KJ607262 | | Campeche | Jardín urbano |
| 089-YN | KJ914774 | | Yucatán | Jardín de Casa |
| 090-YN | KJ914773 | | Yucatán | Jardín de Casa |
| 092-YN | KJ607254 | | Yucatán | Jardín de Casa |
| 131-SP | KJ607259 | | San Luis Potosí | Jardín urbano |
| 132-SP | KJ607260 | | San Luis Potosí | Jardín urbano |
| 120-MS | KJ607256 | | Morelos | Jardín urbano |
| 123-MS | KJ607257 | | Morelos | Parque industrial |
| 68-TS | KJ607253 | | Tamaulipas | Parque industrial |
| 129-TS | KJ607258 | | Tamaulipas | Parque industrial |
| 137-PL | KJ607261 | | Puebla | Jardín urbano |
| 100-CH | KJ914772 | | Chihuahua | Parque deportivo |
| 083-BC | KJ914775 | | Baja California | Parque deportivo |
| 016-NL | KJ914771 | <i>P. fusoidea</i> | Nuevo León | Parque industrial |
| 018-NL | KJ914770 | | Nuevo León | Parque industrial |
| 022-DG | KJ914769 | | Durango | Jardín urbano |
| 030-QR | KJ914768 | | Quintana Roo | Jardín urbano |
| 039-BC | KJ914767 | | Baja California | Parque deportivo |
| 046-BC | KJ914766 | | Baja California | Jardín urbano |
| 099-CH | KJ914765 | | Chihuahua | Jardín urbano |
| 157-CC | KJ914764 | | Campeche | Jardín urbano |

| | | | | |
|--------|----------|-------------------|----------|-------------------|
| 158-CC | KJ914763 | | Campeche | Parque industrial |
| 147-OC | KJ577992 | | Oaxaca | Jardín urbano |
| 034-CL | KJ914761 | <i>P. angusta</i> | Coahuila | Jardín urbano |
| 107-CL | KJ914762 | | Coahuila | Jardín urbano |
| 166-JC | KJ577990 | | Jalisco | Parque deportivo |
| 169-JC | KJ577991 | | Jalisco | Parque deportivo |

3.3.1 Análisis filogenético

La filogenia se determinó mediante árboles de máxima verosimilitud (ML) y Bayesianos, donde el árbol ML se construyó en base al alineamiento hecho con el modelo evolutivo seleccionado y con un soporte nodal evaluado vía bootstrap con 2,000 replicaciones, usando una búsqueda total heurística mediante TOPALi v2 para todos los aislamientos ambientales[115, 116]. En este mismo software se realizó el árbol Bayesiano empleando tres análisis independientes por 10 millones de generaciones y muestreados cada 2,000 generaciones para los aislamientos clínicos. En ambos el grupo externo lo conformaron secuencias ITS de *L. prolificans* para los arboles de los aislamientos ambientales y de *Graphium basitruncatum* para los aislamientos clínicos identificados como *L. prolificans*.

Como se aprecia en los arboles filogenéticos de los aislamientos clínicos y ambientales de las especies del complejo *Scedosporium*, existe una amplia variabilidad genética intra-especie en *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*. Se aprecia que los 7 aislamientos de *S. aurantiacum* presentaron una homología del 100% por lo que

no se encontró esta variabilidad intra-especie como en el resto de las especies (ver Figuras 11-13). Es por esto que es necesario la secuenciación de otra región parcial de genes conservados como β -tubulina, calmodulina, región D1 y D2 del ADNr y hacer comparaciones entre estas regiones y determinar si por medio de estas es posible dilucidar de manera más precisa las especies de este complejo encontradas en México.

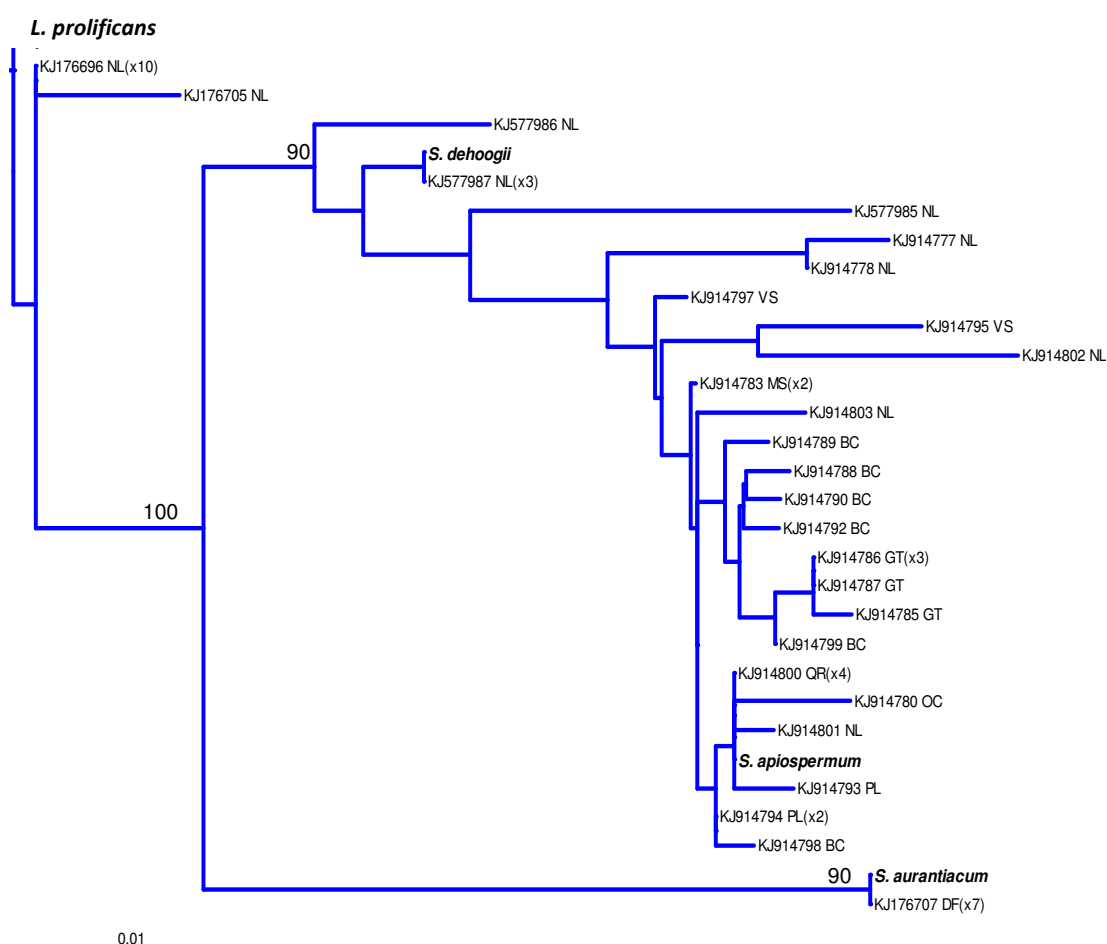


Figura 11. Representación esquemática del árbol filogenético de las especies *S. apiospermum*, *S. dehoogii* y *S. aurantiacum*. Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 90% como se indica en los nodos.

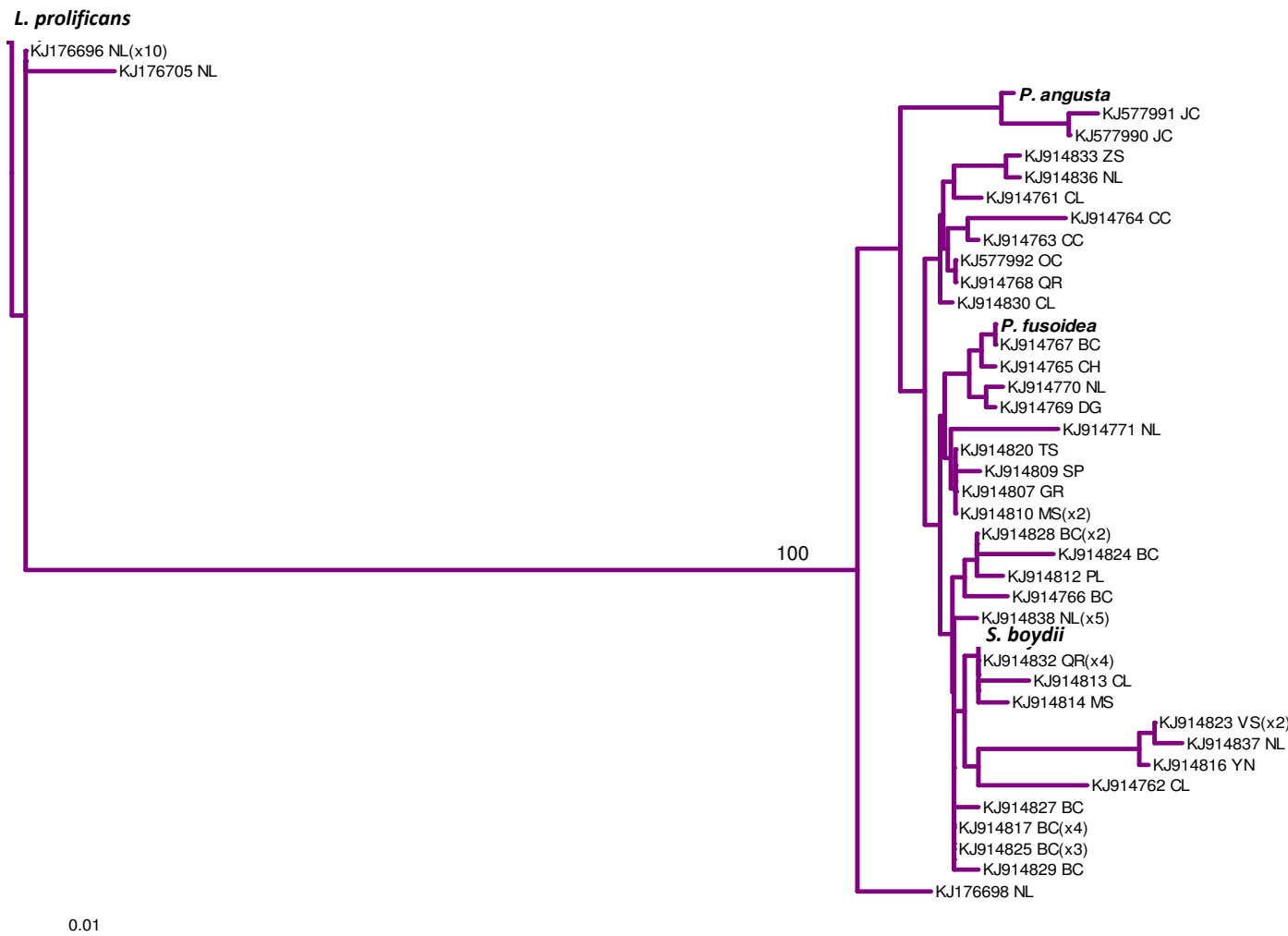


Figura 12. Representación esquemática del árbol filogenético de las especies *S. boydii*, *P. angusta* y *P. fusioidea*. Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 90% como se indica en los nodos.

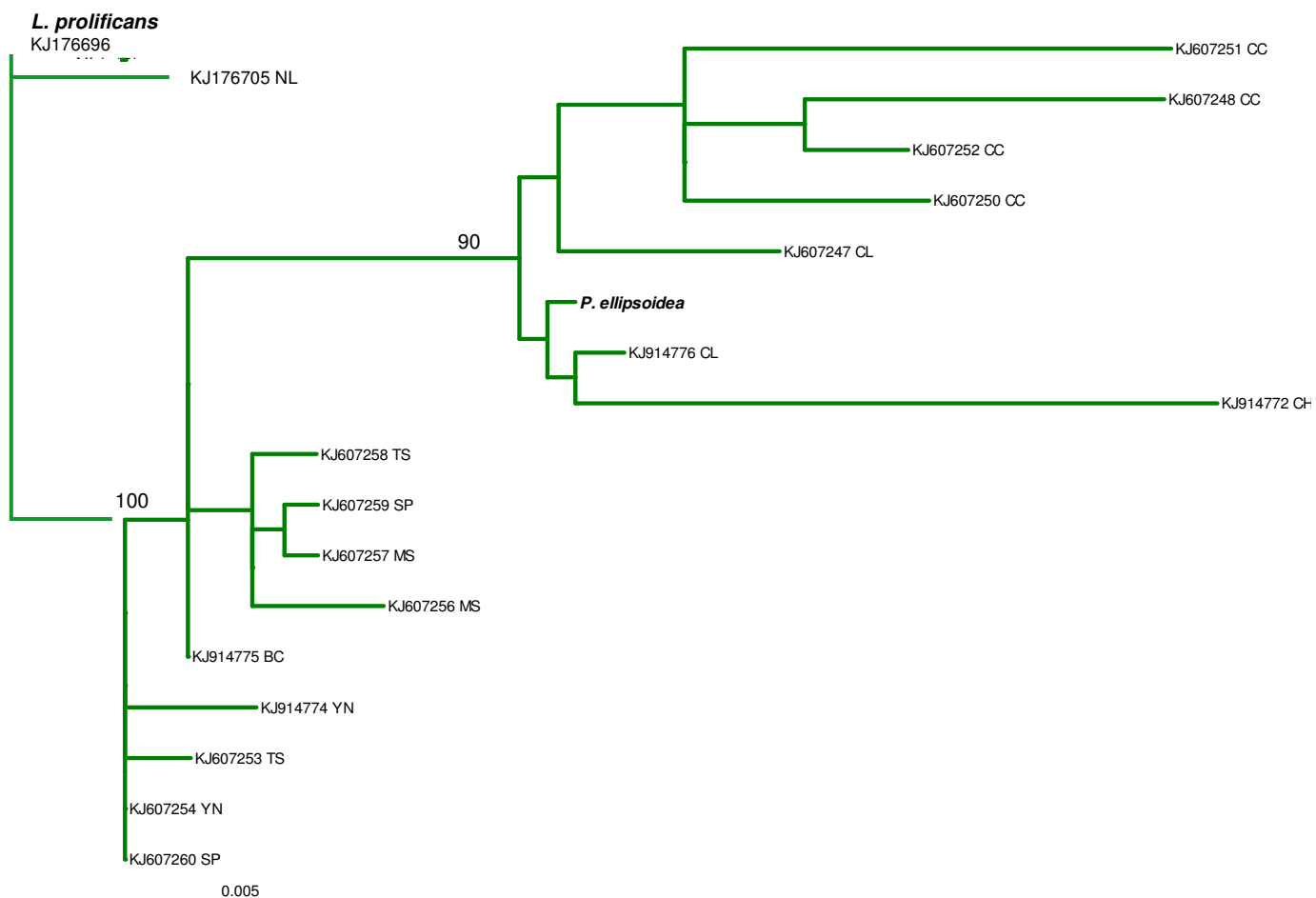


Figura 13. Representación esquemática del árbol filogenético de *P. ellipsoidea*. Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 90% como se indica en los nodos.

Por otra parte se obtuvieron 11 aislamientos clínicos identificados como *L. prolificans*, como ya se mencionó anteriormente. Esta especie está filogenéticamente separada del complejo de *Scedosporium*, sin embargo; son importantes agentes causales de infecciones diseminadas en pacientes con inmunosupresión grave. Al realizar la secuenciación de la región parcial del ITS del ADNr se encontró que todos los aislamientos presentaron un 99.9% de homología, por lo cual al hacer el análisis en la extensión de los 476 nucleótidos que abarcaron la secuencia comparada, se encontró solo un sitio variable dentro del grupo interno (ver Figura 14). Sin embargo, al alinear las secuencias con otras muestras tomadas de regiones distintas, se encontraron 69 sitios variables entre ellas (ver Figura15). La mayoría de éstos se ubicaron hacia los extremos 3' y 5' de las secuencias, específicamente hasta antes del sitio 149 y después del 313, generando una región constante de 165 nucleótidos donde solo uno, en la posición 275, fue variable.

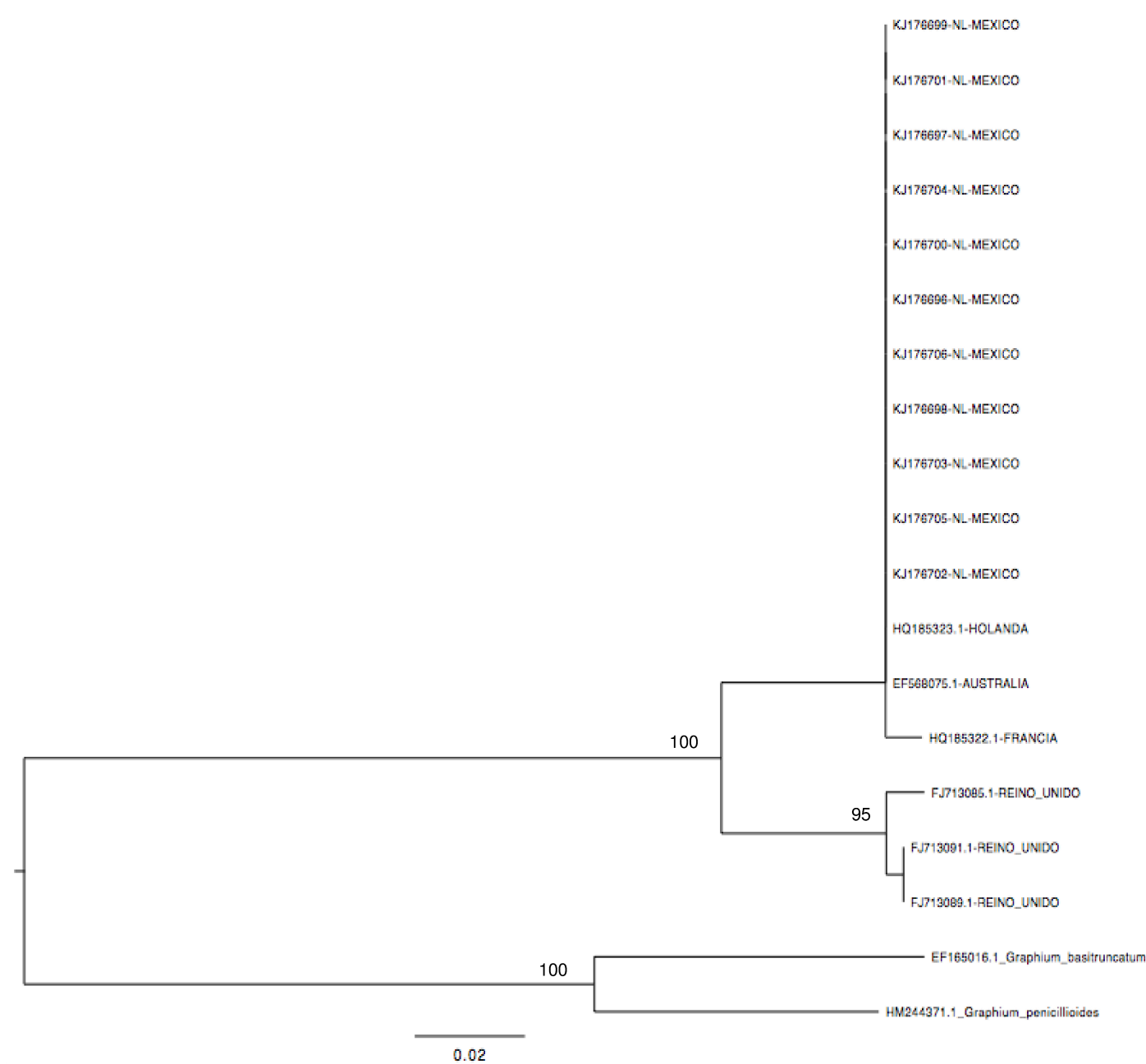


Figura 14. Representación esquemática del árbol filogenético de la especie *L. prolificans*. Los valores de soporte de Bootstrap son superiores al 95% como se indica en los nodos.

3.4 Características fenotípicas

3.4.1 Características macroscópicas y microscópicas

En base a los reportes se ha determinado que el complejo de *Scedosporium* un grupo de microorganismos muy homogéneo ya que morfológicamente no es posible poder diferenciar las distintas especies que lo conforman, tanto microscópica como macroscópicamente. Los resultados obtenidos que se presentan corresponden a un análisis global de todos los aislamientos clínicos y ambientales donde se puede apreciar distintas morfologías macroscópicas evaluando: textura, bordes, producción de exudado, producción de pigmento difusible y color a los 7 y 14 días a 30°C.

Se presentaron 3 tipos de texturas: aterciopelada (78%), algodonosa (20%) y húmeda (2%) (ver Figura16), donde la textura aterciopelada fue la más frecuente presentándose en el 78% de los aislamientos seguida de la algodonosa con el 20%.

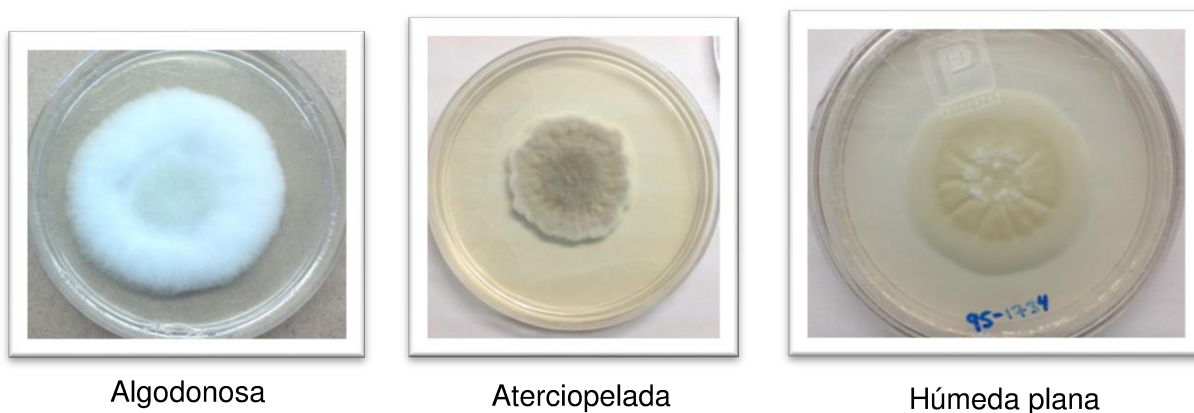


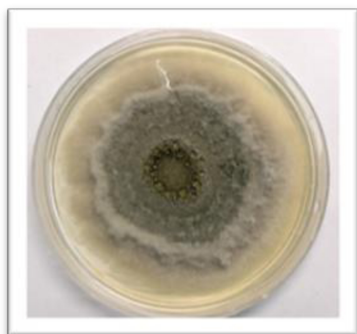
Figura 16. Texturas de las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*

Por otra parte solo se presentaron dos tipos de bordes: irregulares en 64 de los aislamientos y 56 aislamientos con bordes definidos. No hay diferencia significativa entre ambos parámetros ya que la frecuencia en la cual se presentan corresponde al 53% y 47% respectivamente (ver Figura 17).

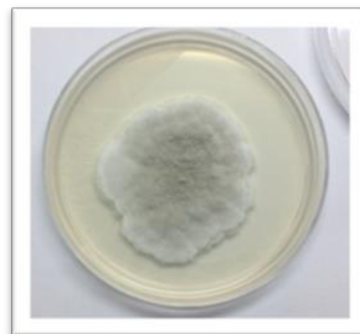


Figura 17. Tipo de borde presente en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.

Por otra parte el 98% de los aislamientos no fueron productores de exudado a los 7 y 14 días a 30°C (ver Figura 18). Sin embargo, la producción de pigmento se presenta de manera más notoria principalmente a los 14 días es por eso que la frecuencia cambia de un 30% a los 7 días a 42% los 14 días en los aislamientos capaces de producir un pigmento amarillo difusible al medio (ver Figura 19). Cabe destacar que *S. aurantiacum* fue la especie con mayor producción de pigmento amarillo difusible.

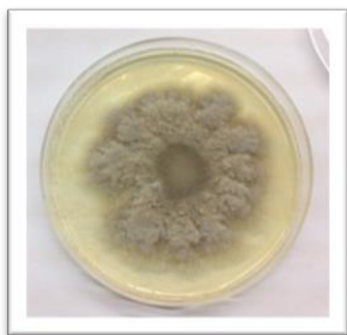


Positivo

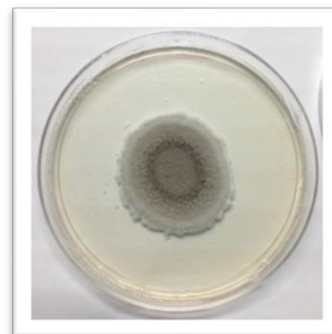


Negativo

Figura 18. Producción de exudado en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.



Positivo



Negativo

Figura 19. Producción de pigmento amarillo difusible al medio en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.

Se observaron 6 colores distintos en las colonias de los diferentes aislamientos a los 7 y 14 días a 30°C (ver Figura 20). Las proporciones de algunos colores cambia de más claros a más oscuros debido a que conforme la colonia madura va adquiriendo coloraciones más oscuras debido a la producción de sus conidios. Los colores con mayor prevalencia a los 7 días fueron el blanco grisáceo el cual se observó en el 67% de los aislamientos, seguido de un color

café amarillento en el 18%. Por otra parte a los 14 días se observó en un 42% el blanco grisáceo y en un 38% el café grisáceo seguido del café amarillento en un 14%.

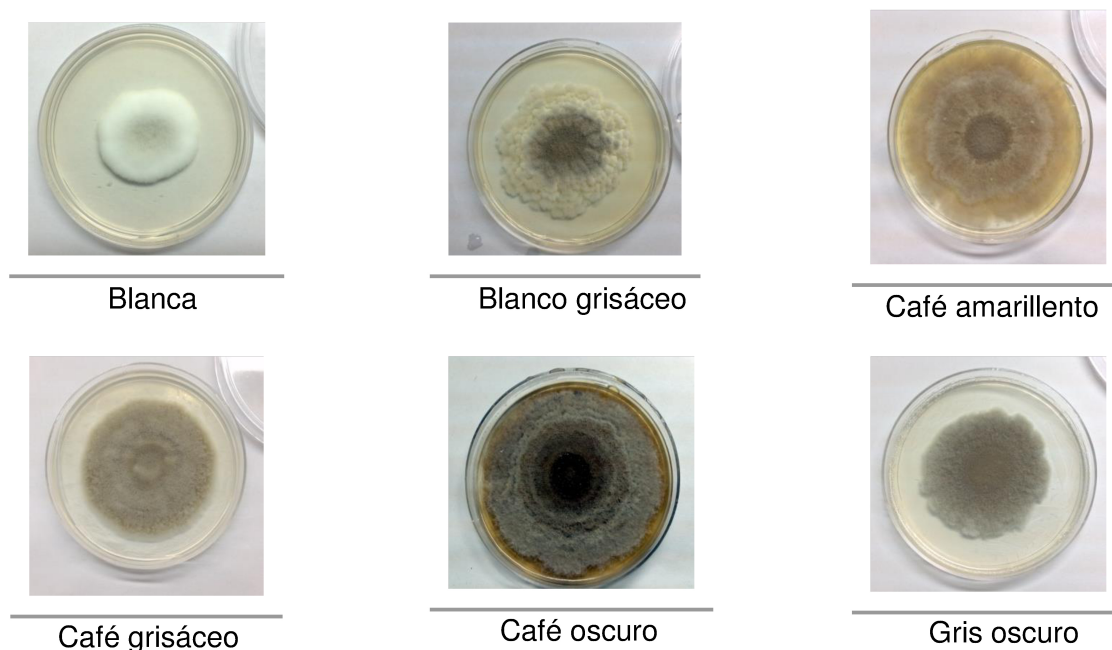


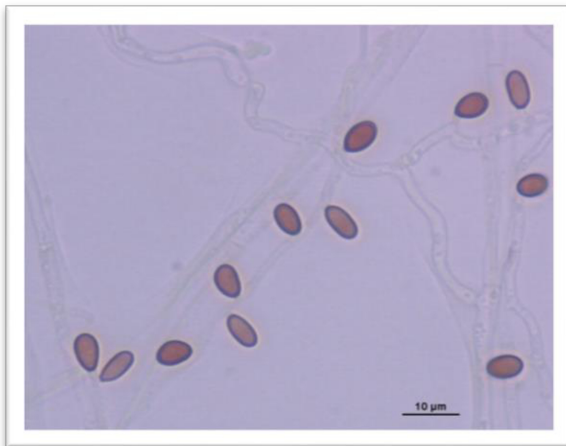
Figura 20. Diferentes colores presentes en las colonias de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.

Los parámetros microscópicos que se evaluaron fueron la medición de estructuras que se encuentran presentes en las fases asexual y sexual del complejo *Scedosporium*. De forma global el rango de medidas de cada una de las siguientes estructuras fue: para los conidios (4.53 – 8.48 μm) con una media de 6.61 μm , cleistotecios (140 – 200 μm) con una media de 168 μm y para los coremios (6.2 – 12.69 μm) con una media de 8.52 μm (ver Figura 21). Cabe

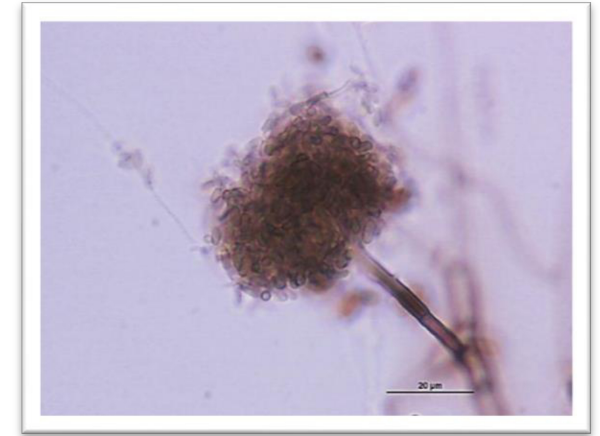
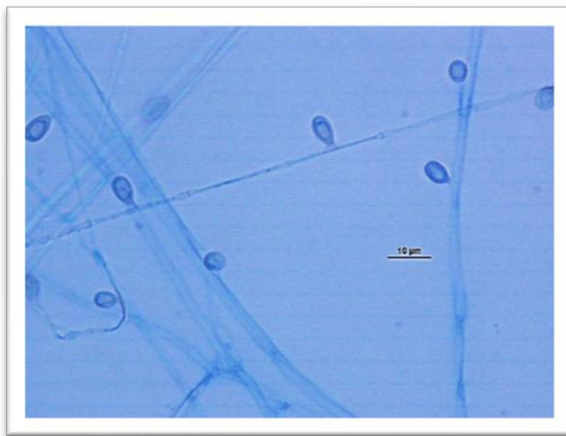
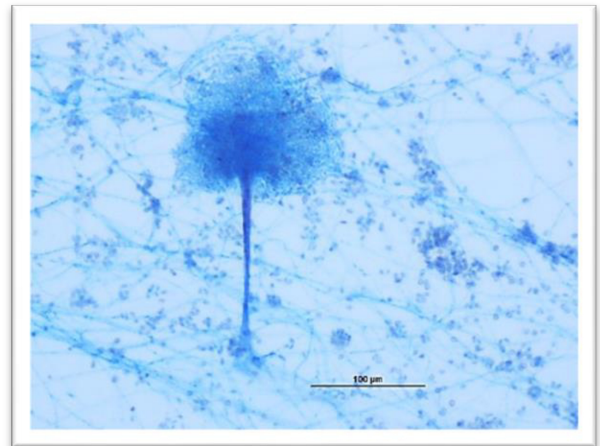
mentonar que estos parámetros tampoco son determinantes para llegar a una identificación precisa de las especies del complejo *Scedosporium*.

Por otra parte a *L. prolificans* si es posible identificarlo de forma microscópica ya que a diferencia de las especies del complejo presenta un conidióforo globoso lo que facilita su identificación morfológica microscópica (ver Figura 22).

**Fase asexual
Conidios**



**Fase asexual
Sinemas o coremios**



**Fase sexual
Cleistotecio**

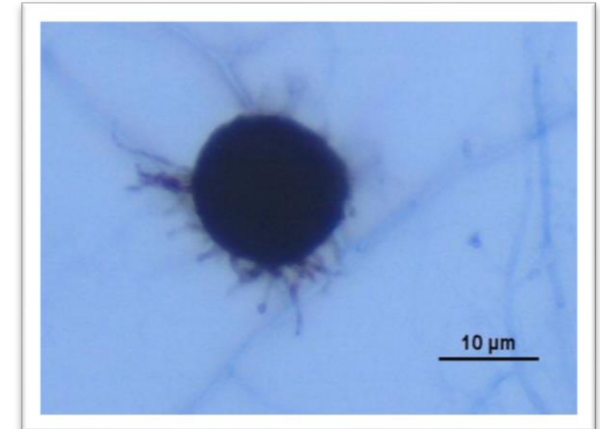
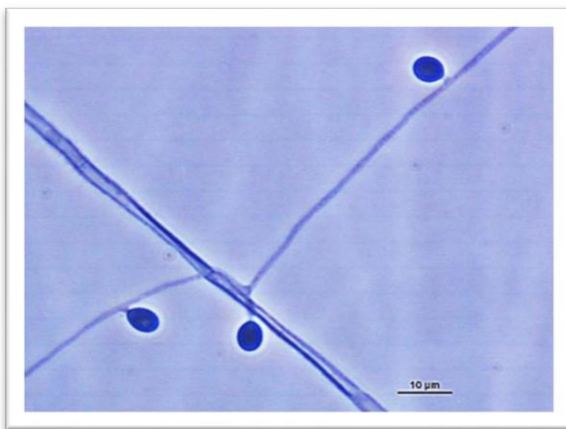


Figura 21. Características morfológicas microscópicas presentes en las especies del complejo *Scedosporium*.

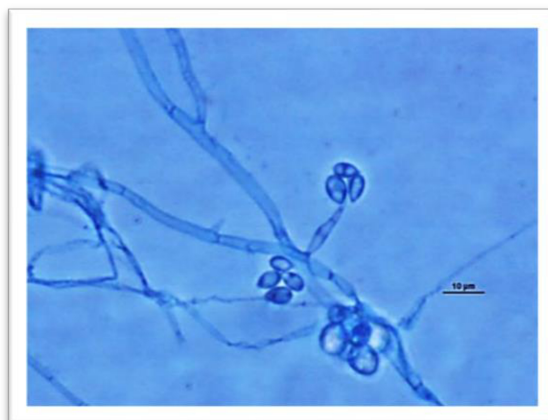


Figura 22. Características morfológicas microscópicas de *L. prolificans*.

3.4.2 Características fisiológicas

3.4.2.1 Termotolerancia

Al someter todos los aislamientos clínicos y ambientales a diferentes temperaturas se puede observar que el crecimiento a temperaturas de 30 y 37°C no se ve afectado y no hay una diferencia significativa en el diámetro de la colonia, a diferencia de lo que se puede observar a 40°C donde hay una reducción del 50% (ver Figura 23) en el diámetro en todos los aislamientos tanto en el día 7 como el día 14. A 45°C no se observó crecimiento en ninguna cepa a los 7 y 14 días (ver Tabla 10).

Tabla 10. Termotolerancia a diferentes temperaturas y diámetro de las colonias desarrolladas.

| Días/Temperatura | 30°C | 37°C | 40°C | 45°C |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| Diámetro (Rango) | | | | |
| 7 días | 2.5 – 6.7 cm | 2.2 – 6.6 cm | 1.1 – 5.1 cm | Negativo |
| 14 días | 4.3 – 8.1 cm | 4.4 – 7.9 cm | 2.1 – 6.9 cm | Negativo |

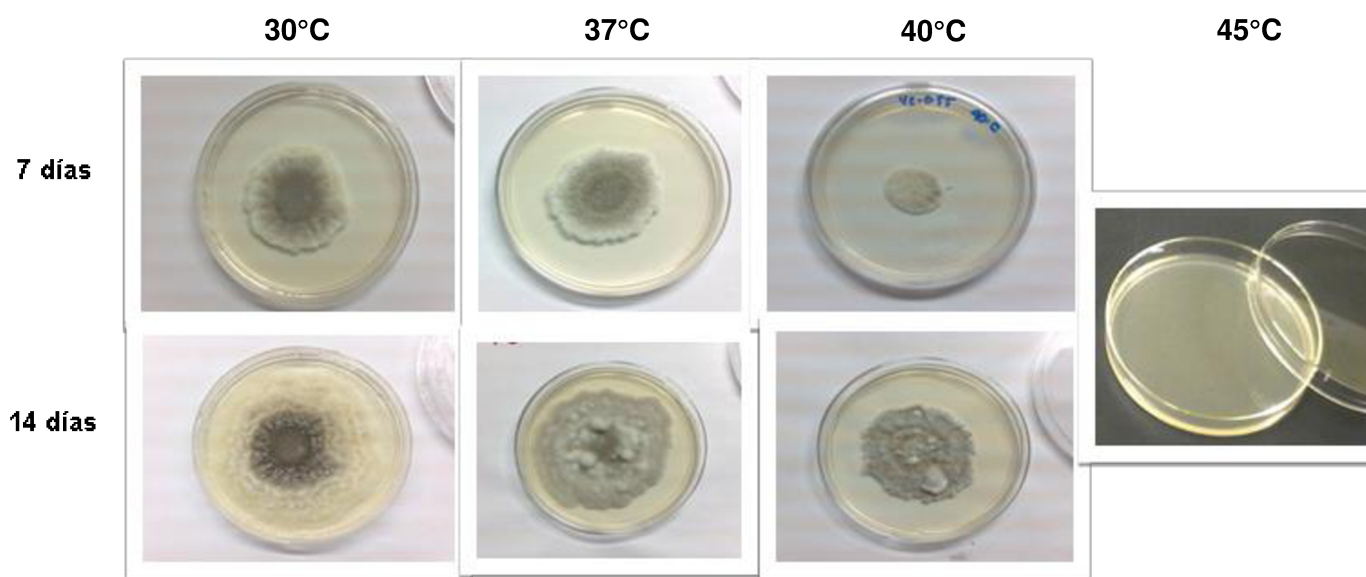


Figura 23. Crecimiento de los aislamientos clínicos y ambientales a diferentes temperaturas del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.

3.4.2.2 Asimilación de carbohidratos

Se realizaron las pruebas de asimilación de diferentes azúcares como: lactosa, L-arabinosa, sacarosa, maltosa y D-ribosa utilizando el protocolo descrito por Yarrow (1980), sin embargo; mediante estas pruebas, las especies del complejo no pudieron ser diferenciadas. La mayoría de las especies del complejo *Scedosporium* presentaron un patrón de asimilación variable. Se encontraron 6 patrones de asimilación en los 103 aislamientos ambientales (ver Tabla 11), donde se puede observar en la figura 24 que el patrón B (lactosa, L-arabinosa, sacarosa, maltosa y D-ribosa fueron positivos) es el más frecuente entre las especies del complejo *Scedosporium*. Cabe mencionar que aunque *S. aurantiacum* solo presentó el patrón A (lactosa, L-arabinosa, sacarosa, maltosa fueron positivos y D- ribosa negativo) no es posible poder diferenciarlo bajo estos parámetros ya que otras especies presentaron este mismo patrón. Por otra parte, *S. apiospermum* fue la especie con mayor variedad de patrones de asimilación lo que podría estar relacionado con la alta variabilidad genética intra-especie que presentan estos hongos.

La variación de asimilación de carbohidratos que se encontró en los 17 aislamientos clínicos fue de 3 patrones diferentes donde el patrón A se presentó en el 100% (ver Figura 25) de las especies de *L. prolificans* (ver tabla 12). Los patrones encontrados en *S. apiospermum* concuerdan con los patrones de asimilación de los aislamientos ambientales, sin embargo; de forma diferencial 3

aislamientos clínicos de *S. boydii* presentaron el patrón de asimilación C (L-arabinosa, sacarosa y maltosa positivas y D- ribosa y lactosa negativas) a diferencia de los aislamientos ambientales que presentaron los patrones A, B y D (ver Tabla 11).

Tabla 11. Patrones de asimilación de carbohidratos de los aislamientos ambientales del complejo *Scedosporium*.

| Patrón | Lactosa | L-arabinosa | Sacarosa | Maltosa | D-ribosa |
|--------|---------|-------------|----------|---------|----------|
| A | + | + | - | + | - |
| B | + | + | + | + | + |
| C | - | + | + | + | - |
| D | - | + | + | - | - |
| E | - | + | + | + | + |
| F | - | + | - | + | - |

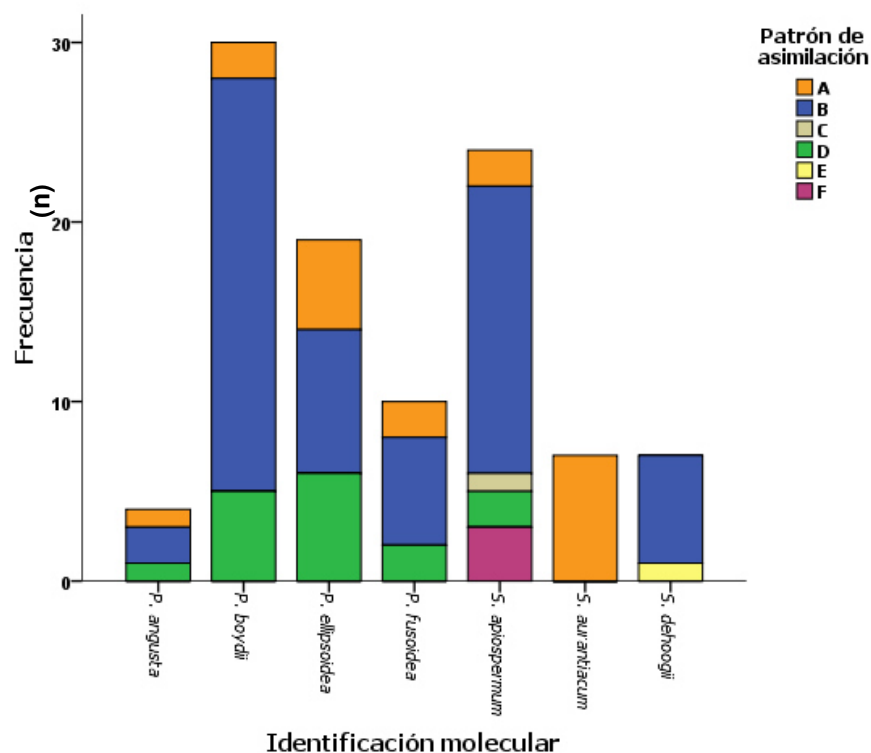


Figura 24. Distribución de los aislamientos ambientales del complejo *Scedosporium* en los diferentes patrones de asimilación.

Tabla 12. Patrones de asimilación de carbohidratos de los aislamientos clínicos del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.

| Patrón | Lactosa | L-arabinosa | Sacarosa | Maltosa | D-ribosa |
|--------|---------|-------------|----------|---------|----------|
| A | + | + | - | + | - |
| C | - | + | + | + | - |
| D | - | + | + | - | - |

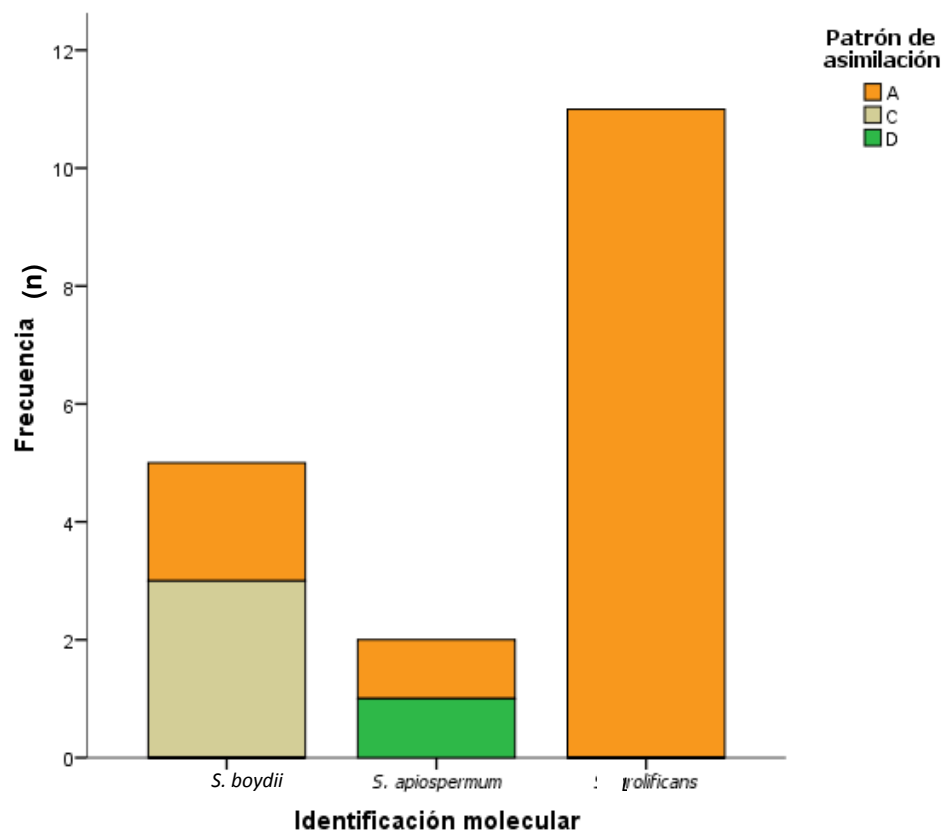


Figura 25. Distribución de los aislamientos clínicos del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans* en los diferentes patrones de asimilación.

3.4.2.3 Actividad enzimática

Se evaluó la actividad de 4 enzimas: ureasa, gelatinasa, proteasa y fosfolipasa en los 120 aislamientos ambientales y clínicos. Se realizó la actividad de proteasa y fosfolipasa siguiendo el procedimiento descrito para *Candida albicans* el cual es un método semicuantitativo. Se realizó una variación al método determinando la actividad enzimática de manera cualitativa debido a la presencia de un precipitado en el centro de la colonia donde se encuentra el

micelio vegetativo encargado de la asimilación de los nutrientes para el desarrollo del hongo (ver Figura 26). En los aislamientos ambientales se encontraron 10 patrones distintos de actividad enzimática (ver Tabla 13) entre las diferentes especies del complejo donde el patrón B (ureasa, gelatinada y fosfolipasa fueron positivos y proteasa negativo) fue el predominante presentándose en 7 especies del complejo (*S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. dehoogii*, *S. aurantiacum*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*) (Ver Figura 27). *S. boydii* y *S. apiospermum* fueron las especies con mayor variabilidad en la actividad de estas enzimas. No se encontró correlación ($p > 0.268$) entre la identificación molecular con respecto a los diferentes patrones enzimáticos que se presentaron.

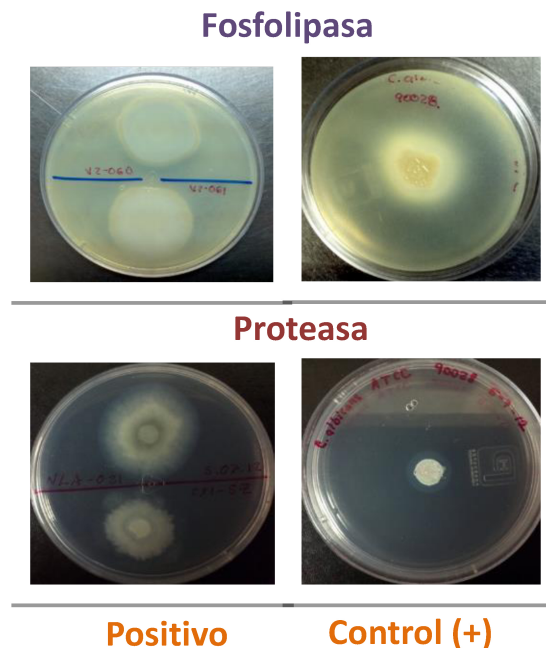


Figura 26. Actividad proteasa y fosfolipasa positiva.

Por otra parte en los aislamientos clínicos, se observó solo el patrón B en las cepas de *L. prolificans*, sin embargo para el resto de las especies se presentaron los mismos patrones que en los aislamientos ambientales (ver Tabla 14). En estos aislamientos se observó una correlación ($p < 0.007$) entre la identificación molecular con respecto a los patrones enzimáticos encontrados ya que *L. prolificans* presentó un solo patrón enzimático. Sabemos que los aislamientos de *S. boydii* y *S. apiospermum* son pocos para esta comparativa, por lo que tendríamos que aumentar el número de éstos para obtener resultados estadísticamente confiables (ver Figura 28).

Tabla 13. Patrones de actividad enzimática de los aislamientos ambientales del complejo *Scedosporium*.

| Patrón | Ureasa | Gelatinasa | Proteasa | Fosfolipasa |
|--------|--------|------------|----------|-------------|
| A | + | + | - | - |
| B | + | + | - | + |
| C | - | - | - | - |
| D | + | + | + | + |
| E | + | - | + | + |
| F | - | + | - | - |
| G | - | + | - | + |
| H | + | - | - | + |
| I | + | - | - | - |
| J | - | + | + | - |

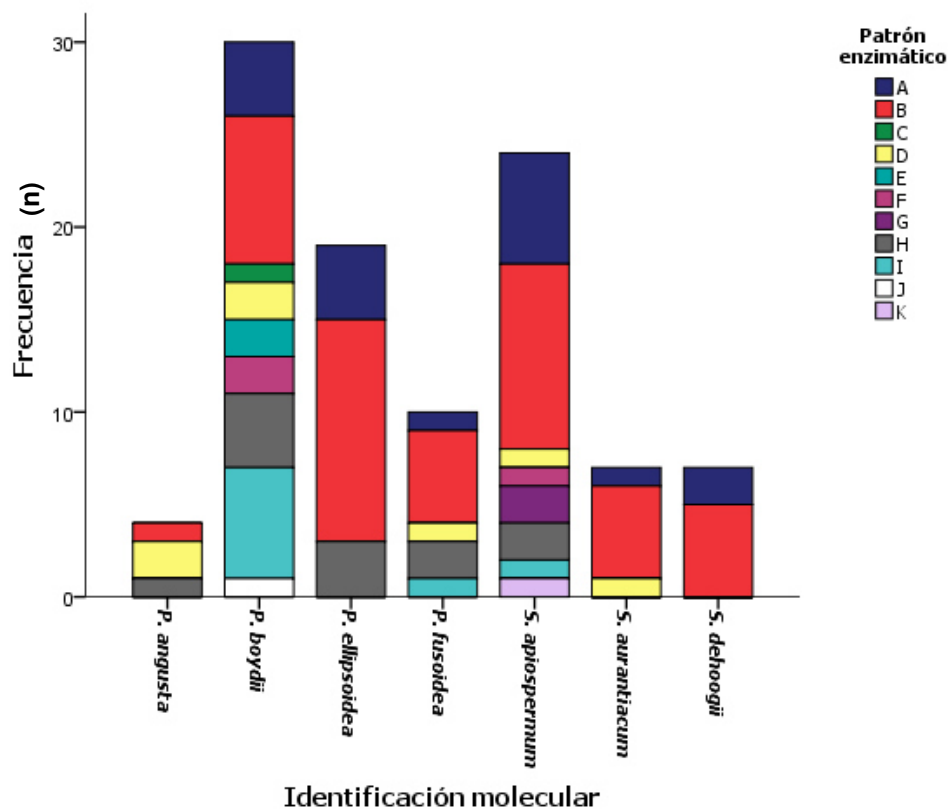


Figura 27. Distribución de los aislamientos ambientales del complejo *Scedosporium* en los diferentes patrones de actividad enzimática.

Tabla 14. Patrones de actividad enzimática de los aislamientos clínicos del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*.

| Patrón | Ureasa | Gelatinasa | Proteasa | Fosfolipasa |
|--------|--------|------------|----------|-------------|
| A | + | + | - | - |
| B | + | + | - | + |
| D | + | + | + | + |
| I | + | - | - | - |

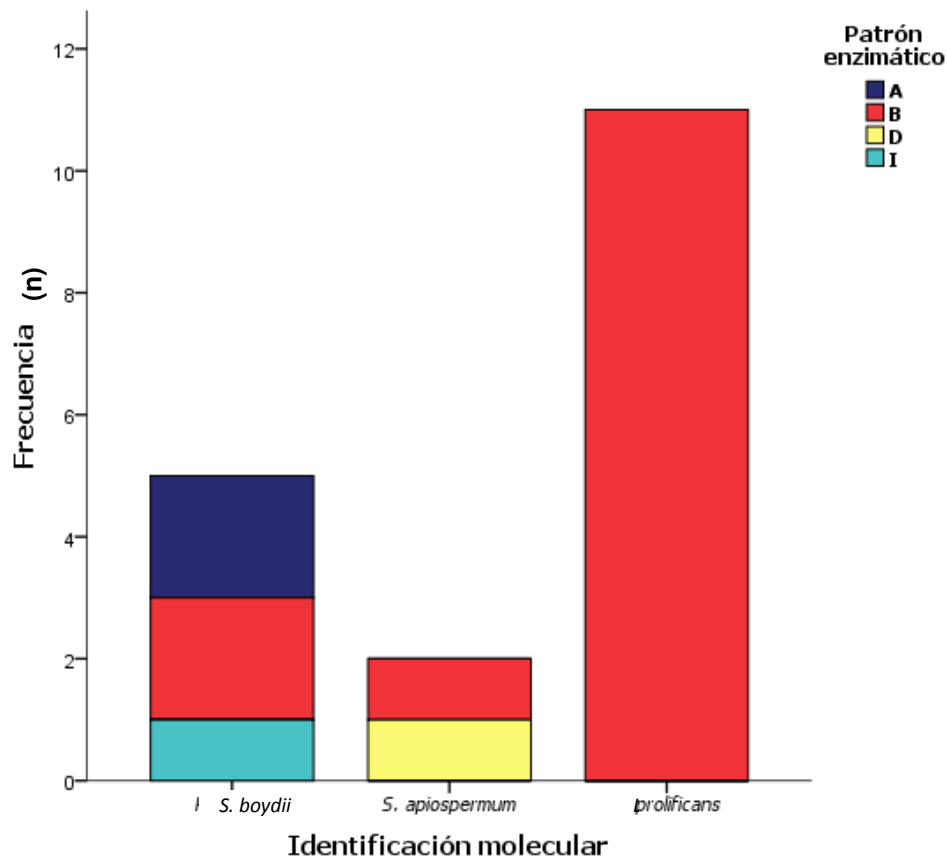


Figura 28. Distribución de los aislamientos clínicos del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans* en los diferentes patrones de actividad enzimática.

3.4.2.4 Susceptibilidad *in vitro*

Los resultados de susceptibilidad *in vitro* que se muestran en la tabla 15 son lecturas realizadas a las 72 hr de acuerdo a los tiempos estipulados por el protocolo M38-A2. Se puede observar que las diferentes especies del complejo presentan CMI's muy altas con rangos de 8 - >16 µg/mL para la AMB, >8 µg/mL para las equinocandinas CAS, MICA y ANI, 8 - 64 µg/mL para el FLC, >64 µg/mL

para FCT, lo que nos indica que son resistentes a la mayoría de los antifúngicos probados. Sin embargo, el VRC es el que tuvo una mejor actividad antifúngica con una CMI que va de 0.5 - 4 µg/mL, seguido del POS con una CMI de 1 - 16 µg/mL. Cabe destacar que en el caso de las equinocandinas se determinó otro parámetro para evaluar su efectividad; la CME que es la concentración mínima del antifúngico capaz de provocar cambios morfológicos en la pared celular del hongo, en base a los anterior se pudo determinar que las equinocandinas presentan un buen efecto antifúngico ya que las CMEs van de 0.06 - 4 µg/mL para ANI, 0.06 - 8µg/mL para MICA y de 0.06 - 4µg/mL para CAS. Estos resultados son un buen indicativo para uso de antifúngicos con distinto mecanismo de acción en terapias combinadas para el tratamiento de las infecciones por estos hongos que presentan una alta resistencia a los antifúngicos convencionales (ver Tabla 15).

Por otra parte, los aislamientos identificados como *L. prolificans* muestran CMIs muy altas presentando resistencia a todos los antifúngicos probados, de igual manera se presentaron altas CMEs para las equinocandinas con rangos que van de 1 - 8µg/mL para ANI, MICA y CAS (ver Tabla 16).

Tabla 15. Susceptibilidad *in vitro* de 109 aislamientos ambientales y clínicos del complejo *Scedosporium*.

| Cepa /Fármaco | CMI 72 hr (µg/mL) | | | | CME 72 hr (µg/mL) | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Rango | MG ^a | 50% ^b | 90% ^c | Rango | MG ^a | 50% ^b | 90% ^c |
| <i>S. apiospermum</i> (26) | | | | | | | | |
| AMB | 8 - > 16 | 12.49 | 16 | > 16 | | | | |
| ANI | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 4 | 0.86 | 0.5 | 2 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.03 - 0.5 | 0.10 | 0.125 | 0.25 |
| CAS | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 4 | 0.82 | 0.5 | 2 |
| VRC | 1 - 4 | 1.81 | 2 | 4 | | | | |
| POS | 2 - 16 | 4.87 | 4 | 16 | | | | |
| FLC | 8 - 64 | 33.62 | 32 | 64 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |
| <i>S. aurantiacum</i> (7) | | | | | | | | |
| AMB | 16 - > 16 | 16 | 16 | >16 | | | | |
| ANI | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 4 | 1.59 | 2 | 2 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.125 - 8 | 0.79 | 0.25 | 4 |
| CAS | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.5 - 4 | 1.59 | 1 | 4 |
| VRC | 0.5 - 1 | 0.56 | 0.5 | 0.5 | | | | |
| POS | 1 - 2 | 1.41 | 1 | 2 | | | | |
| FLC | 16 - 32 | 20.16 | 16 | 32 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |
| <i>S. dehoogii</i> (7) | | | | | | | | |
| AMB | 16 - >16 | 16 | >16 | >16 | | | | |
| ANI | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.06 - 4 | 0.50 | 2 | 4 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.015 -0.25 | 0.08 | 0.25 | 0.125 |
| CAS | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.125 - 4 | 0.5 | 1 | 4 |
| VRC | 0.5 - 1 | 0.76 | 1 | 1 | | | | |
| POS | 1 - 8 | 1.74 | 2 | 8 | | | | |
| FLC | 16 - 64 | 32 | 32 | 64 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |
| <i>S. boydii</i> (36) | | | | | | | | |
| AMB | 0.5 - >16 | 8 | >16 | >16 | | | | |
| ANI | 8 - >8 | 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 2 | 0.29 | 0.25 | 2 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.03 - 2 | 0.16 | 0.25 | 2 |
| CAS | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 2 | 0.38 | 0.25 | 2 |
| VRC | 0.5 - 16 | 1 | 0.5 | >16 | | | | |
| POS | 1 - 16 | 2.30 | 2 | >16 | | | | |
| FLC | 16 - 64 | 27.86 | 32 | > 64 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |

^a MG, media geométrica

^b CMI que inhibe al 50% de la cepas

^c CMI que inhibe al 90% de las cepas

Cont... **Tabla 15.** Susceptibilidad *in vitro* de 109 aislamientos ambientales y clínicos del complejo *Scedosporium*.

| Cepa /Fármaco | CMI 72 hr (µg/ml) | | | | CME 72 hr (µg/ml) | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Rango | MG ^a | 50% ^b | 90% ^c | Rango | MG ^a | 50% ^b | 90% ^c |
| <i>P. angusta</i> (4) | | | | | | | | |
| AMB | 8 - >16 | 12.70 | >16 | >16 | | | | |
| ANI | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.125 - 0.5 | 0.25 | 0.5 | 0.25 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.06 - 0.125 | 0.08 | 0.06 | 0.125 |
| CAS | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| VRC | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | | | | |
| POS | 1 - 2 | 1.26 | 1 | 2 | | | | |
| FLC | 32 | 32 | 32 | 32 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |
| <i>P. fusioidea</i> (10) | | | | | | | | |
| AMB | 8 - >16 | 12.13 | 16 | >16 | | | | |
| ANI | 8 - > 8 | 8 | > 8 | > 8 | 0.03 - 1 | 0.19 | 0.25 | 1 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.015 - 0.125 | 0.05 | 0.06 | 0.125 |
| CAS | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.06 - 0.5 | 0.26 | 0.25 | 0.5 |
| VRC | 0.25 - 2 | 0.76 | 1 | 2 | | | | |
| POS | 1 - 2 | 1.52 | 2 | 2 | | | | |
| FLC | 16 - 64 | 27.86 | 32 | 64 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |
| <i>P. ellipsoidea</i> (19) | | | | | | | | |
| AMB | 4 - >16 | 12.34 | 16 | >16 | | | | |
| ANI | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 2 | 0.71 | 0.5 | 2 |
| MICA | > 8 | > 8 | > 8 | > 8 | 0.06 - 1 | 0.13 | 0.125 | 0.25 |
| CAS | 8 - > 8 | 8 | > 8 | > 8 | 0.25 - 2 | 0.71 | 0.5 | 2 |
| VRC | 0.25 - 1 | 0.5 | 0.5 | 1 | | | | |
| POS | 1 - 8 | 1.68 | 1 | 4 | | | | |
| FLC | 8 - 64 | 22.63 | 16 | 64 | | | | |
| FCT | > 64 | > 64 | > 64 | > 64 | | | | |

^a MG, media geométrica

^b CMI que inhibe al 50% de la cepas

^c CMI que inhibe al 90% de las cepas

Tabla 16. Resultados de susceptibilidad *in vitro* de los asilamientos clínicos de *L. prolificans*.

| Cepa /Fármaco | CMI 72 hr (µg/ml) | | | | CME 72 hr (µg/ml) | | | |
|-----------------------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|------------------|
| | Rango | MG ^a | 50% ^b | 90% ^c | Rango | MG ^a | 50% ^b | 90% ^c |
| <i>L. prolificans</i> (11) | | | | | | | | |
| AMB | 16 - >16 | 16 | 16 | >16 | | | | |
| ANI | 8 - > 8 | 8 | > 8 | > 8 | 2 - 8 | 3.36 | 2 | 8 |
| MICA | 8 - > 8 | 8 | > 8 | > 8 | 1 - 8 | 4 | 4 | 8 |
| CAS | 8 - > 8 | 8 | > 8 | > 8 | 1 - 8 | 4.36 | 4 | 8 |
| VRC | 16 - >16 | 16 | 16 | 16 | | | | |
| POS | 16 - >16 | 16 | >16 | >16 | | | | |
| FLC | 64 - >64 | 64 | > 64 | > 64 | | | | |
| FCT | 64 - >64 | 64 | > 64 | > 64 | | | | |

^a MG, media geométrica

^b CMI que inhibe al 50% de la cepas

^c CMI que inhibe al 90% de las cepas

3.5 Modelo murino de scedosporiosis sistémica

3.5.1 Carga fúngica para especies del complejo *Scedosporium*

Se seleccionaron dos cepas de cada una de las especies identificadas del complejo, cada una de ellas con distinta actividad fosfolipasa, una positiva y la otra negativa con la finalidad de poder comparar la virulencia de cada una de ellas y si ésta estaba directamente relacionada con la producción de esta enzima.

En la tabla 17 se puede observar la carga fúngica para cada una de las especies expresada en Log CFU/g tejido a los 3, 6 y 15 post-infección en

cerebro, bazo y riñón para cada cepa y de una especie. Para *S. apiospermum* se puede observar claramente una diferencia significativa $p < 0.005$ en cerebro y riñón entre las dos cepas, donde vemos claramente que en cerebro las UFCs van de manera ascendente del día 3 al día 15 en la cepa 00-320 productora de fosfolipasa al compararse con la cepa no productora CL-112 que va en descenso, lo mismo se puede observar en riñón ($p < 0.025$). En *S. aurantiacum* se puede ver un comportamiento similar en la cepa HG-175 la cual es productora de fosfolipasa al compararla con la cepa DF-118 no productora donde se puede apreciar un incremento en la carga microbiana del día 3 al día 15 tanto en cerebro como riñón con una diferencia significativa de $p < 0.017$ y $p < 0.001$ respectivamente.

Por otra parte en *S. dehoogii* se puede observar en cerebro una diferencia significativa de $p < 0.001$ entre las cepas NL-103 fosfolipasa positiva y la cepa NL-003 negativa, sin embargo; no existe diferencia en la carga microbiana del día 3 al 15 en riñón, ambas cepas presentaron una carga microbiana estable durante la infección.

En el caso de *S. boydii* no se observó una diferencia en la carga microbiana en cerebro pero si en bazo en los días 3 y 15 post-infección con una diferencia significativa de $p < 0.027$ al comparar la cepa 08-1370 productora de fosfolipasa con la cepa ZS-025 no productora. Para las demás especies no se observó diferencia entre las cepas en los distintos órganos donde se registró una disminución en la carga microbiana del día 3 al día 15 o se presenta una estabilidad durante la infección.

Tabla 17. Carga fúngica del modelo murino de Scedosporiosis sistémica con diferentes especies del complejo *Scedosporium*

| Cepa/ # de acceso GenBank | Órgano | Log CFU/g tejido (mediana [rango]) | | |
|---|----------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | Días post-infección | | |
| | | 3 | 6 | 15 |
| <i>S. apiospermum</i> KJ914803 (00-320) | *Cerebro | 4.88 (4.80 – 5.38) | 5.30 (4.93 – 5.72) | 6.26 (5.93 – 6.43) |
| | Bazo | 3.73 (3.25 – 4.18) | 3.45 (3.22 – 3.56) | 3.61 (2.90 – 4.32) |
| | **Riñón | 2.92 (2.56 – 3.20) | 3.72 (3.61 – 3.73) | 5.00 (4.55 – 5.30) |
| KJ607255 (CL-112) | Cerebro | 3.64 (3.43 – 3.64) | 3.91 (3.65 – 4.38) | 1.78 (1.72 – 1.86) |
| | Bazo | 4.36 (4.20 – 4.50) | 4.44 (4.17 – 4.60) | 4.39 (4.18 – 4.60) |
| | Riñón | 3.22 (2.85 – 3.51) | 4.30 (3.62 – 4.47) | 3.14 (2.83 – 3.34) |
| <i>S. aurantiacum</i> KJ176711 (HG-175) | *Cerebro | 3.99 (3.57 – 4.08) | 4.95 (4.60 – 5.18) | 5.07 (4.62 – 5.43) |
| | Bazo | 3.40 (3.28 – 3.63) | 3.17 (3.11 – 3.40) | 3.20 (3.11 – 3.64) |
| | Riñón | 2.57 (2.50 – 2.84) | 2.57 (2.49 – 2.87) | 2.57 (2.45 – 2.58) |
| KJ176707 (DF-118) | Cerebro | 4.86 (4.61 – 5.14) | 3.98 (3.63 – 5.00) | 2.70 (2.60 – 3.04) |
| | Bazo | 3.10 (2.92 – 3.42) | 3.34 (3.28 – 3.68) | 2.22 (2.08 – 2.36) |
| | Riñón | 1.56 (1.48 – 1.80) | 2.62 (2.53 – 2.85) | 0 |
| <i>S. dehoogii</i> KJ577989 (NL-103) | Cerebro | 3.90 (3.74 – 4.04) | 3.84 (3.61 – 4.14) | 2.82 (2.60 – 3.34) |
| | Bazo | 4.00 (3.87 – 4.08) | 3.88 (3.44 – 3.98) | 3.66 (3.50 – 4.18) |
| | Riñón | 3.28 (2.95 – 3.62) | 3.04 (2.90 – 3.30) | 3.10 (3.04 – 3.18) |
| KJ577986 (NL-003) | Cerebro | 3.74 (3.62 – 3.90) | 2.65 (2.59 – 2.76) | 0 |
| | Bazo | 4.46 (4.34 – 4.72) | 4.22 (3.99 – 4.34) | 4.11 (3.99 – 4.32) |
| | Riñón | 3.19 (2.90 – 3.20) | 3.08 (2.81 – 3.23) | 3.00 (2.83 – 3.15) |
| <i>S. boydii</i> KJ914836 (08-1370) | Cerebro | 4.15 (3.68 – 4.32) | 4.48 (4.14 – 4.61) | 2.68 (2.58 – 2.85) |
| | *Bazo | 3.94 (3.63 – 4.04) | 4.73 (4.34 – 5.11) | 5.52 (5.32 – 6.18) |
| | Riñón | 2.97 (2.66 – 3.30) | 2.97 (2.72 – 3.15) | 2.98 (2.81 – 3.36) |
| KJ914833 (ZS-025) | Cerebro | 4.18 (3.64 – 4.40) | 4.34 (3.90 – 4.65) | 1.63 (1.58 – 2.56) |
| | Bazo | 3.88 (3.79 – 4.23) | 4.05 (3.91 – 4.18) | 3.76 (3.60 – 4.23) |
| | Riñón | 2.79 (2.72 – 3.08) | 2.78 (2.56 – 2.92) | 3.02 (2.80 – 3.11) |
| <i>P. angusta</i> KJ577990 (JC-166) | Cerebro | 3.73 (3.60 – 3.88) | 3.59 (3.54 – 3.73) | 2.68 (2.59 – 2.94) |
| | Bazo | 5.32 (5.23 – 5.38) | 4.87 (4.58 – 5.20) | 4.45 (4.23 – 4.52) |
| | Riñón | 4.19 (3.98 – 4.56) | 3.96 (3.89 – 4.20) | 3.57 (3.17 – 3.82) |
| KJ577991 (JC-169) | Cerebro | 3.71 (3.66 – 4.00) | 3.67 (3.61 – 3.96) | 2.66 (2.58 – 3.18) |
| | Bazo | 5.18 (4.87 – 5.50) | 4.92 (4.82 – 5.00) | 4.64 (4.04 – 5.04) |
| | Riñón | 4.20 (4.04 – 4.25) | 4.11 (3.97 – 4.17) | 3.80 (2.49 – 4.08) |
| <i>P. fusioidea</i> KJ577992 (OC-147) | Cerebro | 4.17 (3.70 – 4.40) | 3.68 (3.61 – 3.74) | 3.59 (3.50 – 3.60) |
| | Bazo | 4.43 (4.32 – 4.57) | 4.16 (4.14 – 4.45) | 4.02 (3.70 – 4.08) |
| | Riñón | 3.60 (3.30 – 3.74) | 3.54 (2.62 – 3.56) | 3.29 (3.15 – 3.53) |

| | | | | |
|---|---------|--------------------|--------------------|--------------------|
| KJ914764 (CC-157) | Cerebro | 3.36 (2.66 – 3.75) | 3.98 (3.81 – 4.08) | 3.62 (3.54 – 3.97) |
| | Bazo | 5.02 (4.11 – 5.15) | 4.76 (4.14 – 4.83) | 4.41 (4.17 – 4.51) |
| | Riñón | 3.31 (2.72 – 3.54) | 3.47 (3.17 – 3.62) | 3.16 (2.89 – 3.63) |
| <i>P. ellipsoidea</i> KJ914776 (CL-035) | Cerebro | 3.98 (3.61 – 4.48) | 3.82 (3.64 – 4.20) | 2.60 (2.59 – 2.60) |
| | Bazo | 4.84 (4.84 – 4.20) | 4.63 (4.43 – 4.67) | 4.19 (3.86 – 4.42) |
| | Riñón | 3.95 (3.84 – 4.20) | 3.66 (3.59 – 3.90) | 3.60 (3.50 – 3.90) |
| KJ607256 (MS-120) | Cerebro | 3.64 (3.43 – 3.64) | 3.91 (3.65 – 4.38) | 2.78 (2.72 – 2.86) |
| | Bazo | 4.36 (4.20 – 4.50) | 4.44 (4.17 – 4.60) | 4.39 (4.18 – 4.60) |
| | Riñón | 3.22 (2.85 – 3.51) | 4.30 (3.62 – 4.47) | 3.14 (2.83 – 3.34) |

Debido a que este complejo de especies está ampliamente relacionado con enfermedades sistémicas y que se ha reportado un tropismo hacia sistema nervioso central tanto en pacientes inmucompetentes como con inmunosupresión se decidió establecer una infección sistémica en ratones inmunocompetentes para determinar la virulencia de las distintas cepas y su tropismo hacia los distintos órganos.

Los análisis histopatológicos muestran un fuerte proceso inflamatorio en cerebro seguido de riñón en la cepa 00-320 de *S. apiospermum*, con respecto al control tal y como se muestra en la Figura 29 donde se puede observar una gran migración celular formando zonas granulomatosas lo que conlleva al daño cerebral en los ratones. A partir del tercer día post-infección se presentó descoordinación, pérdida de peso y espasmos de manera progresiva hasta llegar a la muerte. Claramente la cepa 00-320 productora de fosfolipasa fue más virulenta que la cepa no productora de fosfolipasa CL-112. De igual forma en la tinción de Gomori-Grocott se pueden observar las estructuras fúngicas en el

tejido cerebral de ambas cepas de *S. apiospermum*, lo que concuerda con la carga fúngica obtenida (ver Figura 30). El mismo comportamiento se observó en riñón y bazo para ambas cepas como se puede apreciar en los cortes histopatológicos (ver Figuras 31 - 34).

De igual forma los aislamientos probados de *S. aurantiacum* presentaron el mismo comportamiento que las cepas de *S. apiospermum* con respecto al resto de las cepas donde se observó una disminución en el proceso inflamatorio del día 3 al día 15 en los diferentes órganos, lo que concuerda con los resultados obtenidos en la carga microbiana para las cepas de *S. boydii*, *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*, se anexa un ejemplo del proceso inflamatorio y la presencia de estructuras fúngicas en bazo y riñón donde se puede apreciar claramente este comportamiento.

Figura 29. Cortes histopatológicos de cerebro de cepas de *S. apiospermum* teñidos con hematoxilina-eosina a los días 3, 6 y 15 post-infección.

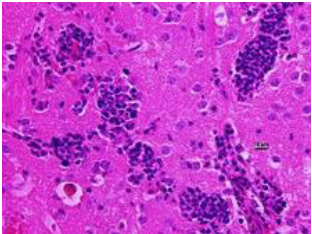
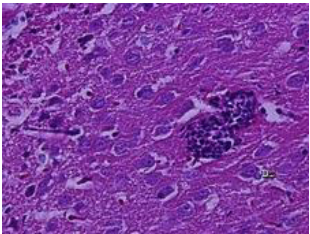
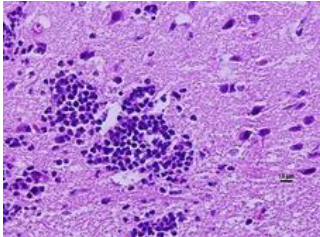
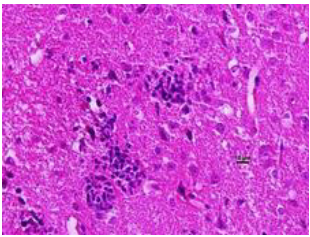
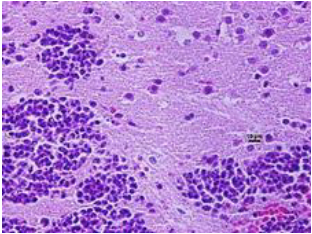
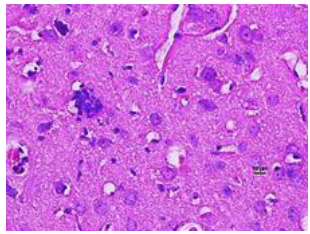
| Control sano/día | <i>S. apiospermum</i> | |
|------------------|---|---|
| | KJ914803 (00-320) | KJ607255 (CL-112) |
| 3 |  |  |
| 6 |  |  |
| 15 |  |  |

Figura 30. Cortes histopatológicos de cerebro de cepas de *S. apiospermum* teñidos con Gomori-Grocott a los 3, 6 y 15 días post-infección.

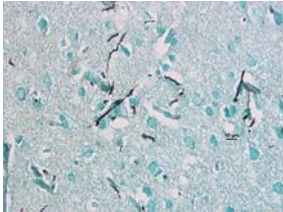
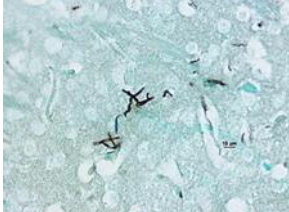

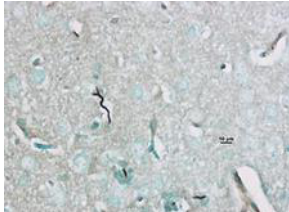
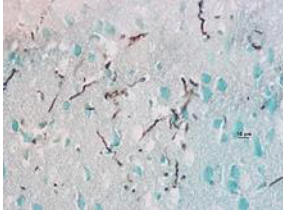
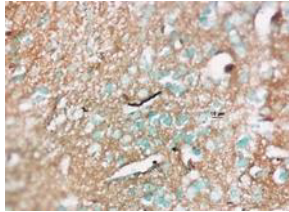
| Control sano/día | <i>S. apiospermum</i> | |
|------------------|---|---|
| | KJ914803 (00-320) | KJ607255 (CL-112) |
| 3 |  |  |
| 6 |  |  |
| 15 |  |  |

Figura31. Cortes histopatológicos de bazo de cepas de *S. apiospermum* teñidos con hematoxilina-eosina a los días 3, 6 y 15 post-infección.

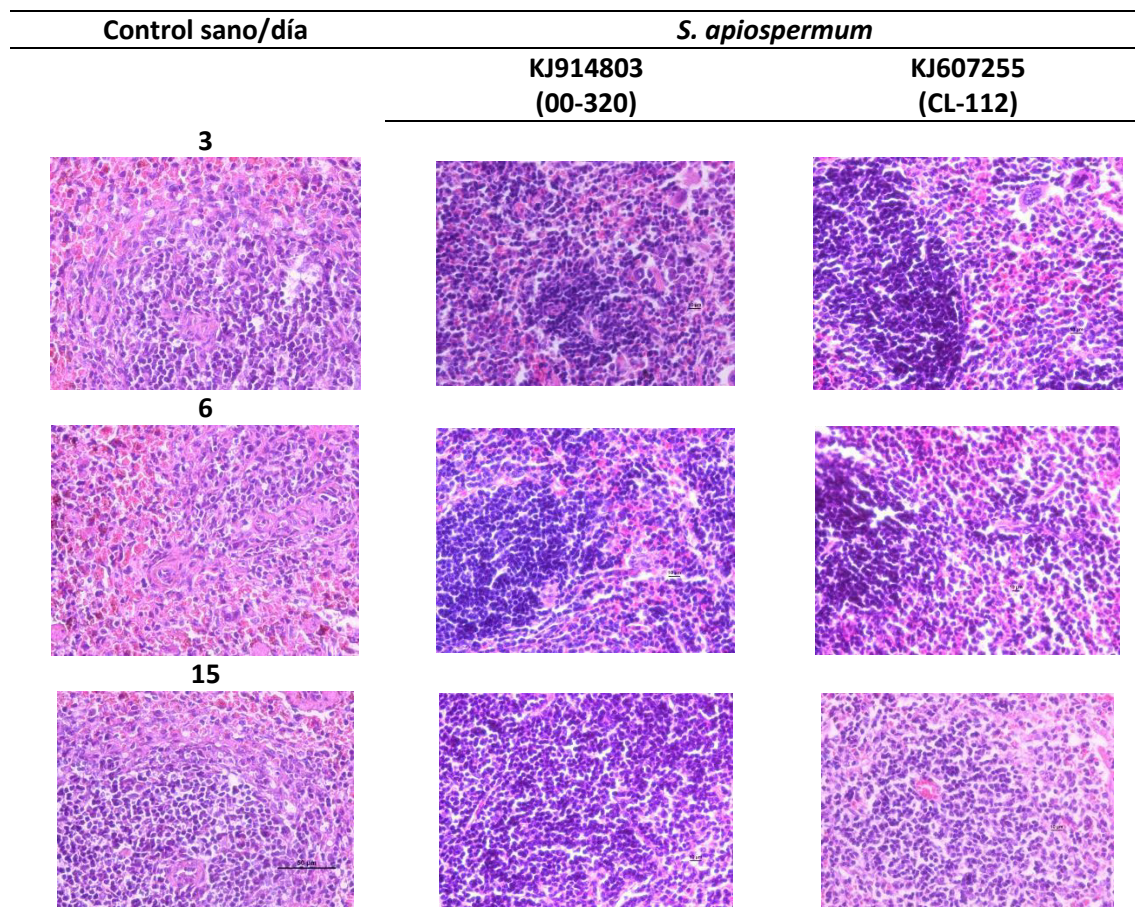


Figura 32. Cortes histopatológicos de bazo de cepas de *S. apiospermum* teñidos con Gomori-Grocott a los 3, 6 y 15 días post-infección.

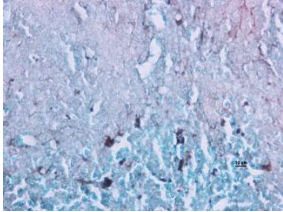
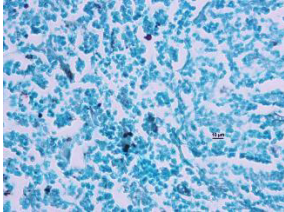
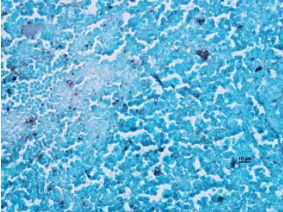
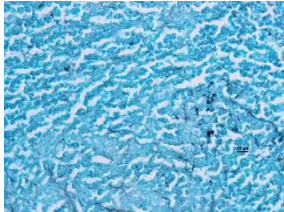
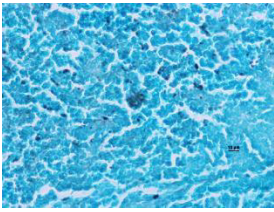
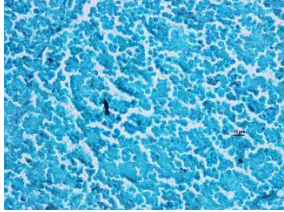
| Control sano/día | <i>S. apiospermum</i> | |
|------------------|---|---|
| | KJ914803 (00-320) | KJ607255 (CL-112) |
| 3 |  |  |
| 6 |  |  |
| 15 |  |  |

Figura 33. Cortes histopatológicos de riñón de cepas de *S. apiospermum* teñidos con hematoxilina-eosina a los días 3, 6 y 15 post-infección.

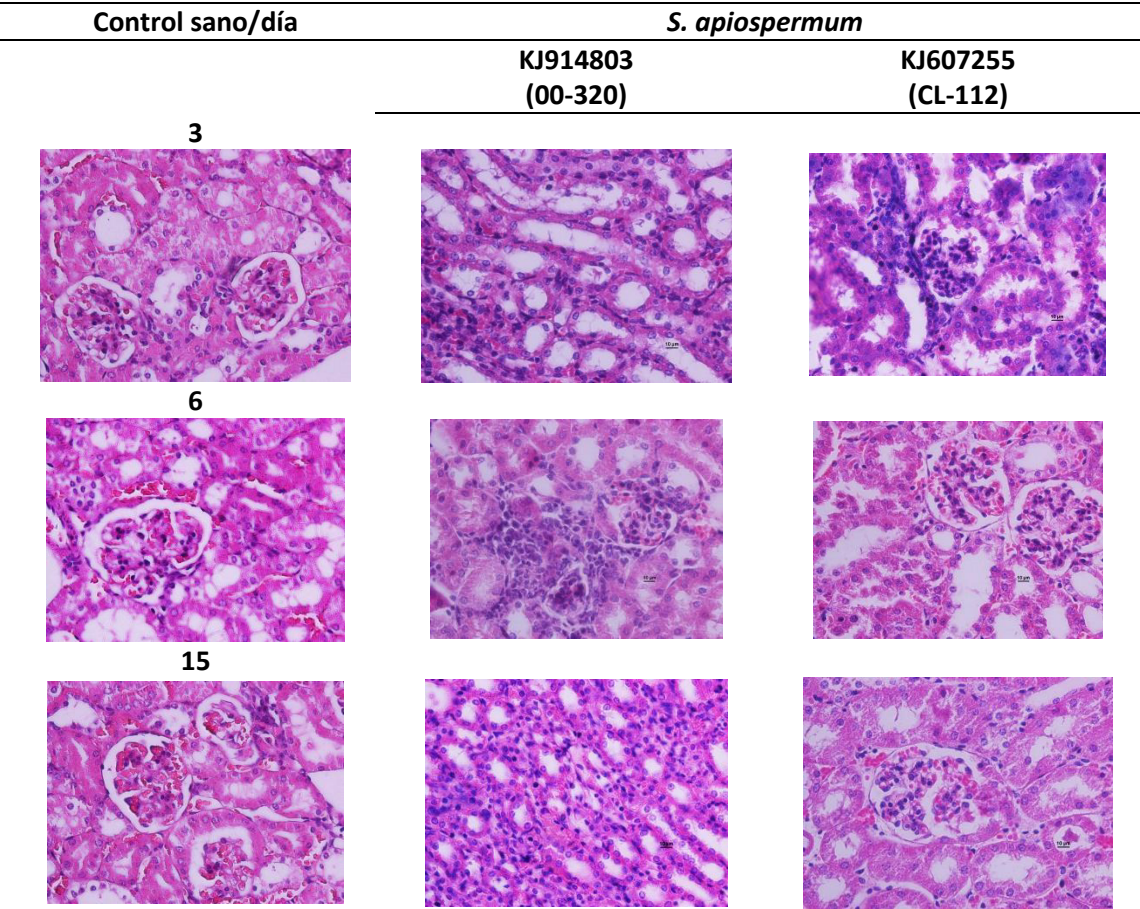
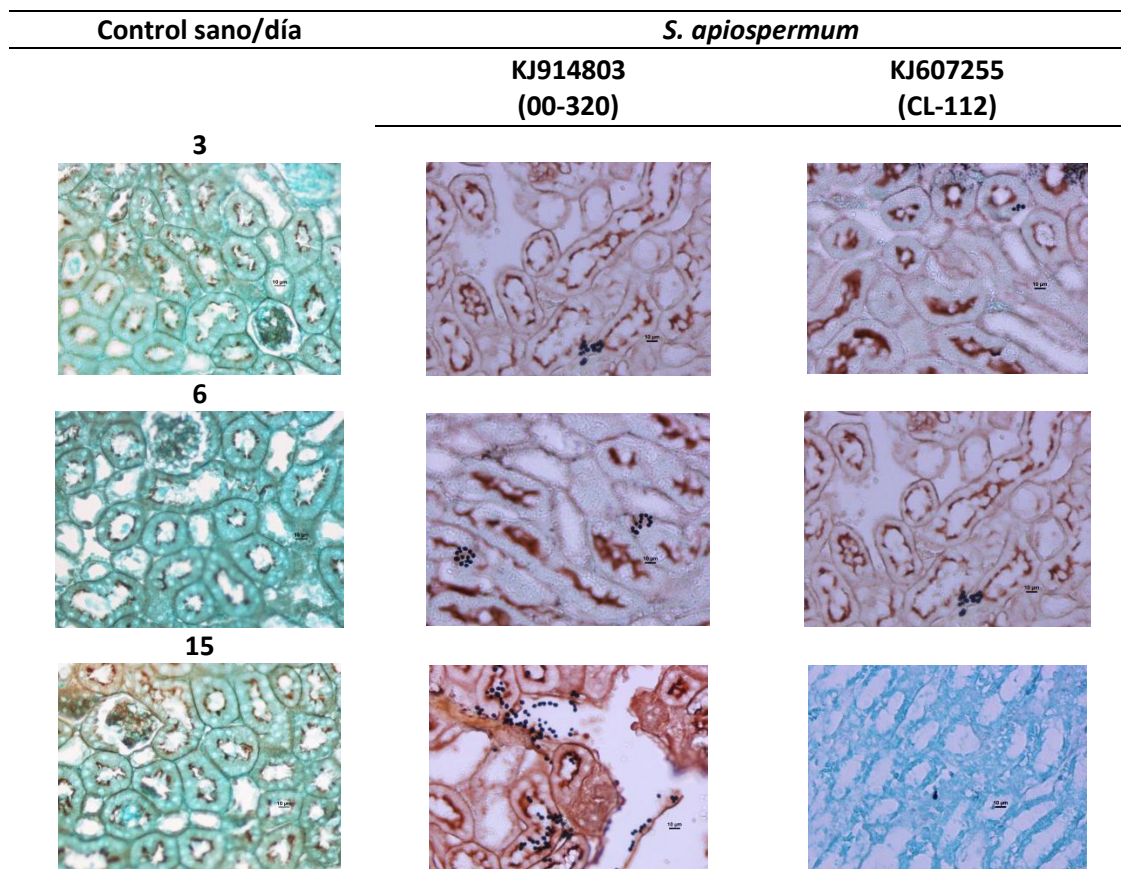


Figura 34. Cortes histopatológicos de riñón de cepas de *S. apiospermum* teñidos con Gomori-Grocott a los 3, 6 y 15 días post-infección.



3.5.2 Estudio de supervivencia y carga microbiana de cepas de *L. prolificans*

Debido a que *L. prolificans* es un hongo ampliamente reportado como agente causal de infecciones diseminadas en pacientes inmunosuprimidos, determinamos evaluar la virulencia de las cepas identificadas a partir de aislamientos clínicos, las tres cepas evaluadas en el modelo murino de supervivencia y de carga microbiana fueron productoras de fosfolipasa.

Se llevó a cabo la infección vía sistémica de los diferentes aislamientos monitoreando la muerte de los animales por 30 días. En la Figura 35 se puede observar que la cepa 07-2239 fue la más virulenta provocando una mortalidad del 100% a los 14 días post-infección seguido de la cepa 11-2242 con el 90% y finalmente la cepa 04-2673 la cual provocó la muerte del 60% de los animales a los 30 días post-infección. Al realizar el análisis estadísticos mediante la prueba de Log Rankse puede ver que existe una diferencia significativa de $P < 0.017$ entre las tres cepas de *L. proliferans* probadas (ver Tabla 18).

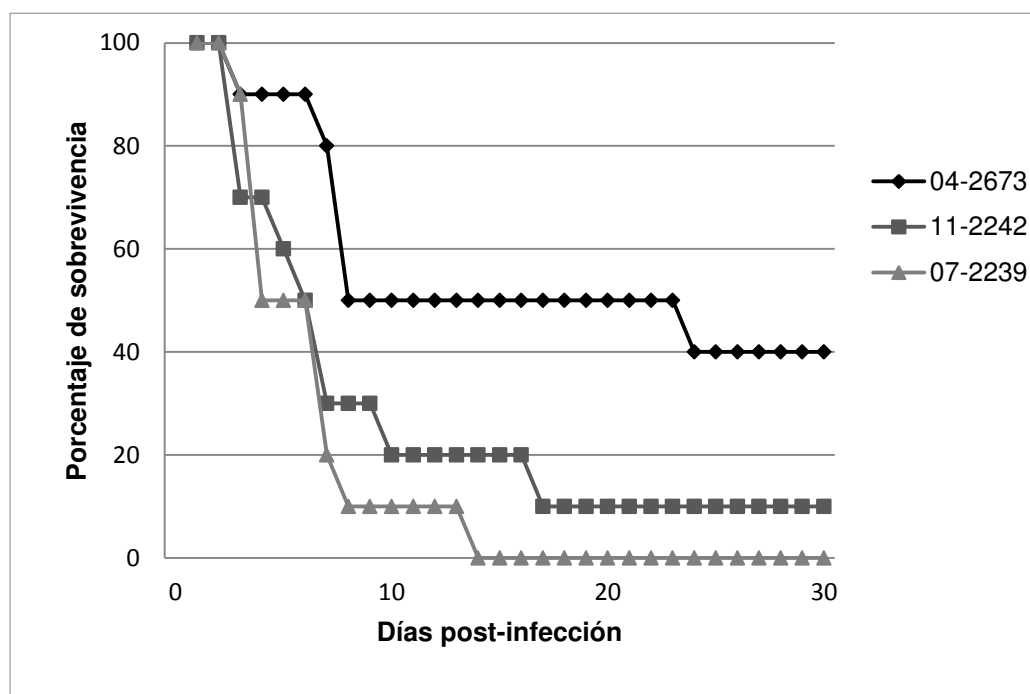


Figura 35. Estudio de supervivencia en un modelo murino de infección sistémica por diferentes cepas de *L. proliferans*.

Tabla 18. Media del tiempo de sobrevivencia (MTS) de ratones infectados con diferentes cepas de *L. prolificans*.

| Especie | Cepa | MTS [95% IC] (días) | Mortalidad (%) |
|-----------------------|-------------|----------------------------|-----------------------|
| <i>L. prolificans</i> | 04-2673 | 17.8 (10.85 – 24.75) | 60 |
| | 11-2242 | 9.1 (4.11 – 14.08) | 90 |
| | 07-2239 | 6.2 (4.18 - 8.22) | 100 |

MTS [95% IC], media del tiempo de sobrevivencia [95% intervalo de confianza].

Log Rank test: diferencia significativa ($P < 0.017$) entre las tres cepas de *L. prolificans*

Los estudios de carga fúngica para las especies de *L. prolificans* en el modelo murino de infección sistémica se llevaron a cabo bajo criterios diferentes a los establecidos para las especies del complejo, para esto se llevó a cabo un estudio piloto estableciendo en base a estos resultados el inóculo y los días de experimentación más adecuados para nuestro estudio. Los parámetros establecidos para este modelo fueron los siguientes: se trabajó con un inóculo de 1×10^3 UFC/mL ya que este nos permitía la sobrevivencia de los animales por 15 días y se establecieron tres sacrificios los días 4, 7 y 10 post-infección.

Los resultados obtenidos en el modelo de carga microbiana mostraron un tropismo por el sistema nervioso central de igual manera que las especies del complejo de *Scedosporium*, por otra parte no se observó diferencia significativa en la carga microbiana entre las tres cepas probadas en los distintos órganos (ver Tabla 19).

Debido al tropismo hacia cerebro y el comportamiento de las tres cepas es muy homogéneo se anexan las imágenes correspondientes a este órgano en particular. En la figura 36 se observó el proceso inflamatorio con abundante migración celular formando granulomas mediante la tinción de H y E en cerebro, esto conlleva de manera progresiva al deterioro del sistema nervioso central para llegar finalmente a la muerte en los animales infectados con las tres cepas de *L. proliferans*. Por otra parte la figura 37 muestra las estructuras fúngicas las cuales se observan mediante la tinción de Gomori-Grocott en las tres cepas en cerebro.

Tabla 19. Carga fúngica del modelo murino de infección sistémica con diferentes especies de *L. proliferans*.

| Cepa/# de acceso del GenBank | Órgano | Log UFC/g tejido (mediana [rango]) | | |
|--|---------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| | | Días post-infección | | |
| | | 3 | 6 | 15 |
| <i>S. proliferans</i> KJ176701 (07-2239) | Cerebro | 5.02 (4.73 – 5.07) | 4.96 (5.40 – 4.60) | 4.79 (4.67 – 5.95) |
| | Bazo | 3.75 (3.48 – 4.01) | 3.51 (3.45 – 3.60) | 3.22 (3.12 – 3.31) |
| | Riñón | 3.05 (2.99 – 3.14) | 2.90 (2.85 – 2.95) | 2.56 (2.45 – 2.82) |
| KJ176704 (11-2242) | Cerebro | 4.88 (4.74 – 5.09) | 4.73 (4.56 – 4.94) | 4.71 (4.64 – 5.23) |
| | Bazo | 3.85 (3.68 – 3.95) | 3.65 (3.55 – 3.66) | 3.34 (3.08 – 3.54) |
| | Riñón | 3.10 (3.04 – 3.16) | 2.98 (2.89 – 3.00) | 2.55 (2.49 – 2.87) |
| KJ176697 (04-2673) | Cerebro | 4.70 (4.25 – 5.08) | 3.65 (3.58 – 3.68) | 3.81 (3.71 – 3.86) |
| | Bazo | 3.59 (3.49 – 3.88) | 3.31 (3.12 – 3.46) | 2.28 (2.22 – 2.44) |
| | Riñón | 2.70 (2.63 – 3.11) | 2.59 (2.48 – 2.67) | 2.11 (1.96 – 2.26) |

Figura 36. Cortes histopatológicos de cerebro teñidos con hematoxilina-eosina a los días 4, 7 y 10 post-infección con *L. proliferans*.

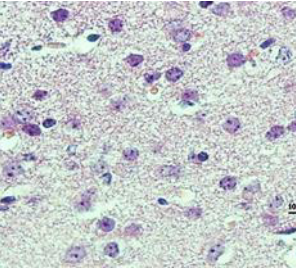
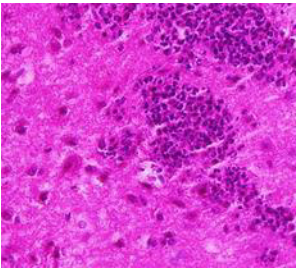
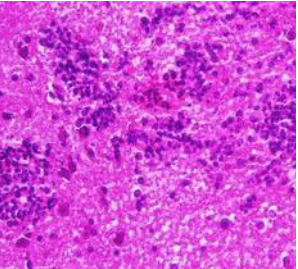
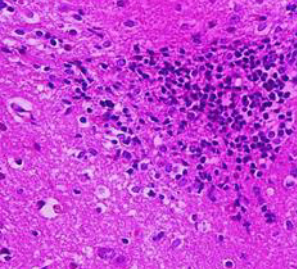
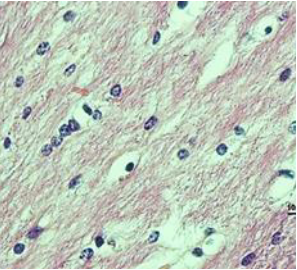
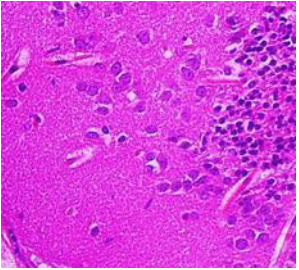
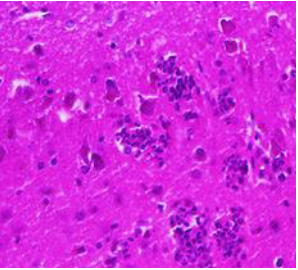
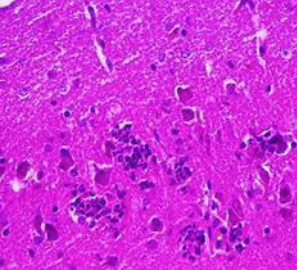
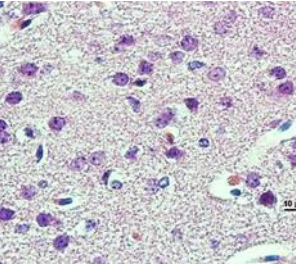
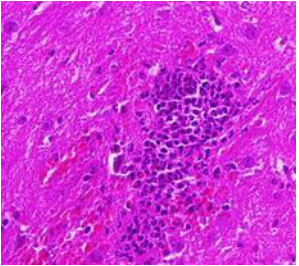
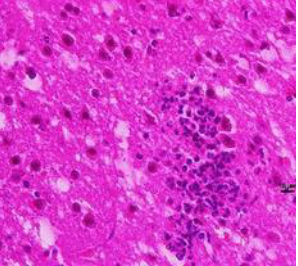
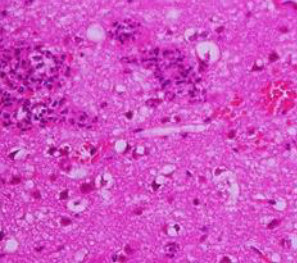
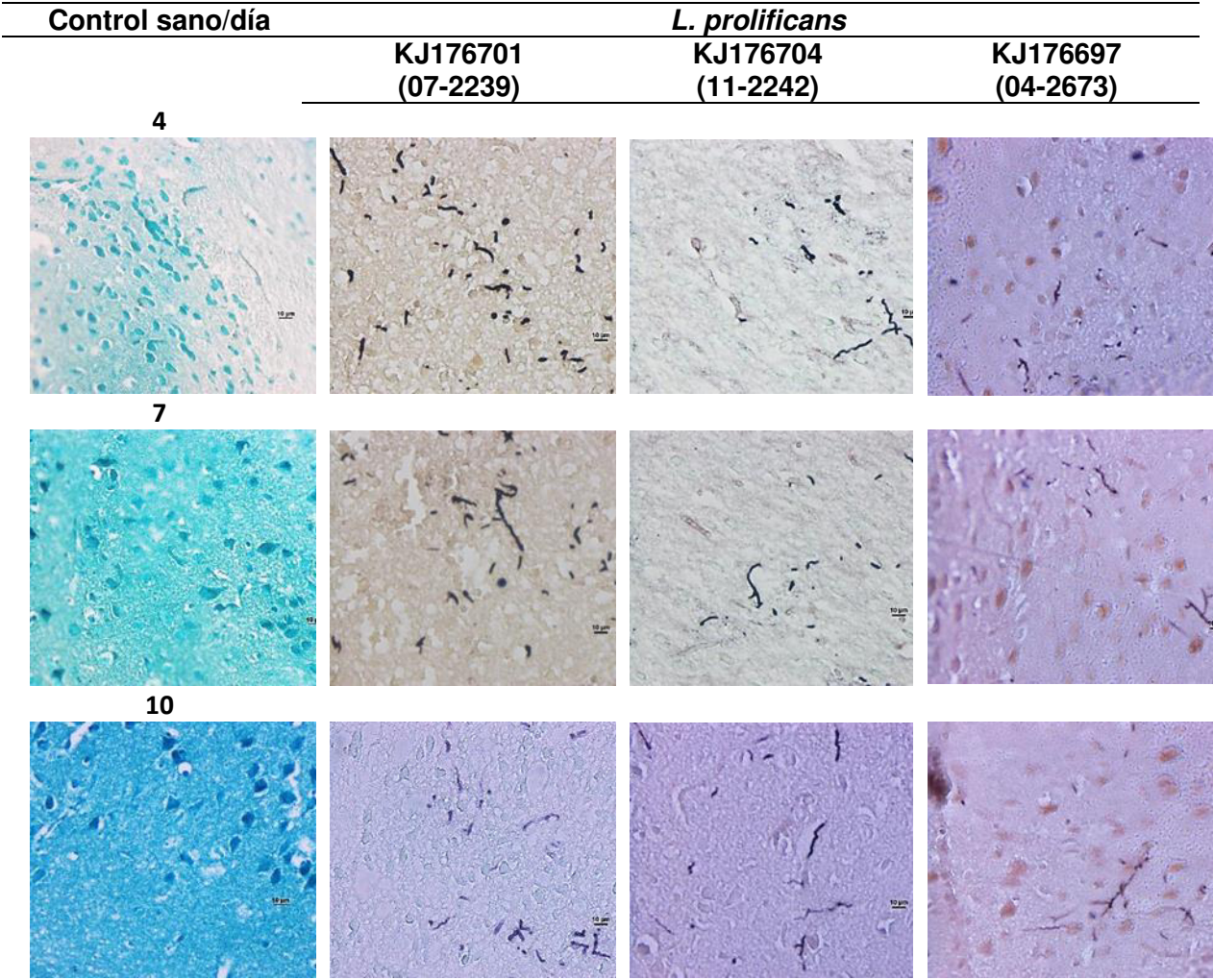
| | Control sano/día | <i>L. proliferans</i> | | |
|----|---|---|--|---|
| | | KJ176701 (07-2239) | KJ176704 (11-2242) | KJ176697 (04-2673) |
| 4 |  |  |  |  |
| 7 |  |  |  |  |
| 10 |  |  |  |  |

Figura 37. Cortes histopatológicos de cerebro teñidos con Gomori-Grocott a los días 4, 7 y 10 post-infección con *L. proliferans*.



3.6 Correlación de la identificación molecular, con los datos de sitio de aislamiento, zona geográfica, pH del suelo y actividad proteasa y fosfolipasa entre los aislamientos clínicos y ambientales del complejo *Scedosporium* y *L. prolificans*

Se realizaron diferentes comparaciones entre los hallazgos moleculares y fenotípicos de los aislamientos clínicos y moleculares del complejo *Scedosporium* para establecer la existencia de alguna correlación entre las especies encontradas y el área geográfica, pH del suelo, sitio de aislamiento y la actividad enzimática específicamente de aquellas enzimas relacionadas con la virulencia como la producción de proteasa y fosfolipasa.

En la figura 38 se comparó la identificación molecular con el área geográfica donde los aislamientos identificados como *S. boydii* y *S. apiospermum* tienen una distribución muy amplia en todo el país lográndose aislar desde la zona norte hasta sur. Por otra parte los aislamientos de *S. aurantiacum* presentaron una tendencia a encontrarse del centro sur al sureste del México y *P. fusioidea* presentó una tendencia hacia el sur y el norte pero no hacia el centro y occidente del país. Sin embargo no existió diferencia significativa ($p > 0.215$) entre la identificación molecular con respecto a la zona geográfica de aislamiento, cabe mencionar que el número de cepas es pequeño lo que hace difícil establecer un análisis estadístico más confiable.

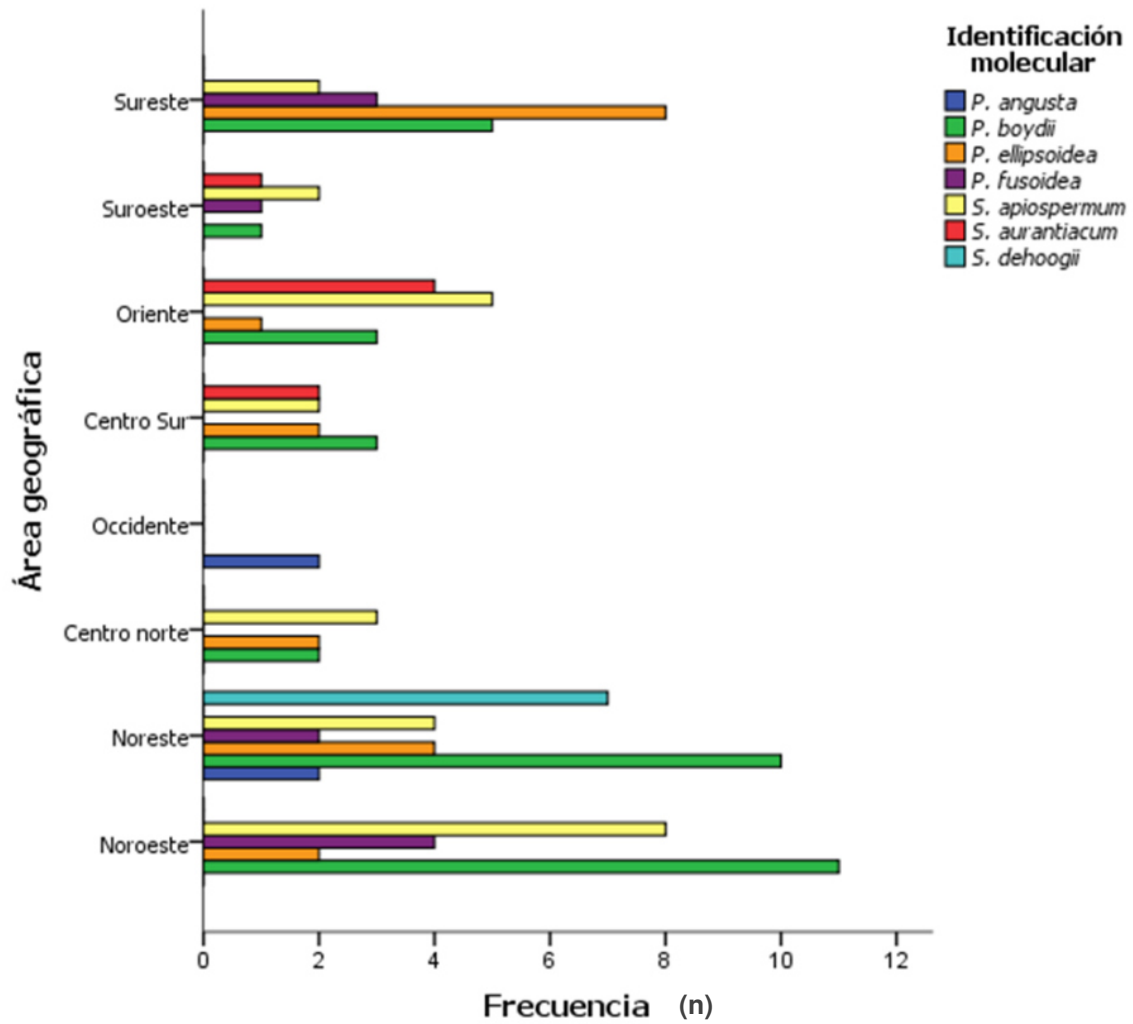


Figura 38. Correlación entre la identificación molecular y la zona geográfica de las especies del complejo identificadas en México.

En la siguiente gráfica se llevó a cabo la comparación entre la identificación molecular con el origen de los aislamientos, se puede observar que la mayoría de las especies del complejo se aislaron con una mayor frecuencia de jardines urbanos, seguida de parques industriales, cabe destacar que todos los aislamientos de *S. dehoogii* fueron aislados a partir de muestras de lodos de plantas tratadoras de agua (PTA). Por otra parte, aunque se encontró una diferencia significativa ($p < 0.015$) entre el origen de los aislamientos y cada una de las especies, debe tenerse en cuenta que para algunas especies del complejo la muestra fue pequeña (ver Figura 39).

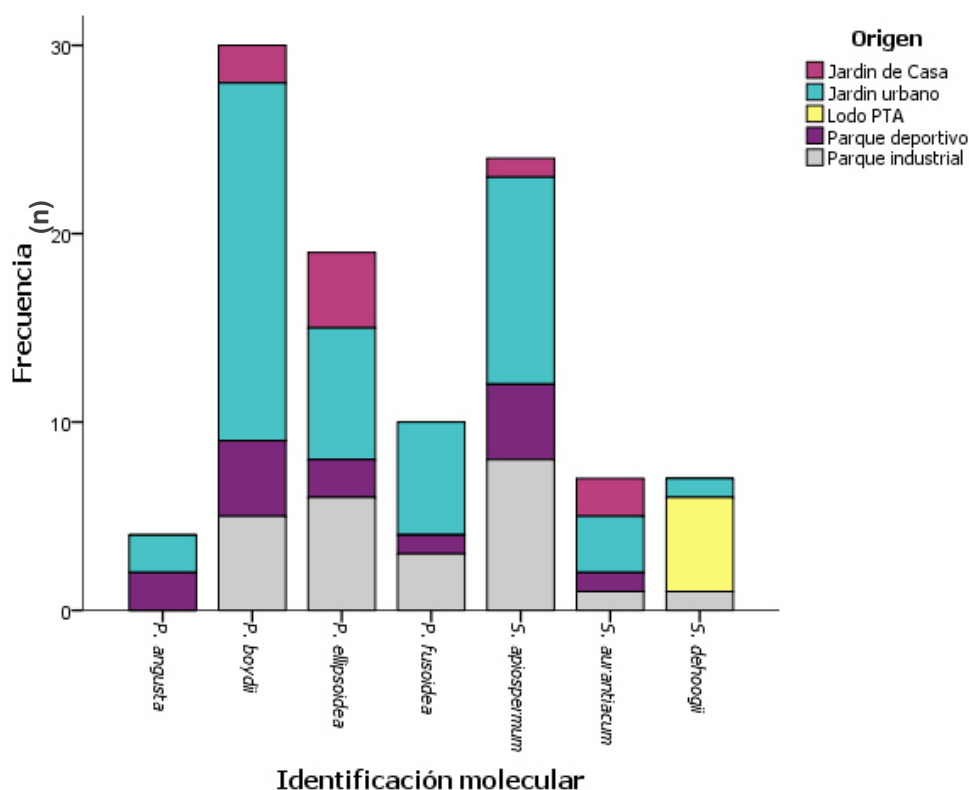


Figura 39. Correlación entre la identificación molecular y sitios de aislamiento de las especies del complejo identificadas en México.

De igual forma al comparar la identificación molecular con el pH del suelo se puede observar que la mayoría de las especies no tuvieron una predilección por un pH en particular o un rango establecido sino que éstas están presentes en una gran variedad de pH. *S. boydii* muestra una tendencia a encontrarse con mayor proporción en suelos con pH ya sea ácido o alcalino pero en una baja proporción a un pH neutro a diferencia del resto de las especies. *P. ellipsoidea* mostró una tendencia a aislarse con mayor proporción en suelos con pH alcalino. Sin embargo; no hubo diferencia significativa ($p > 0.215$) entre la identificación molecular y el pH del suelo (ver Figura 40).

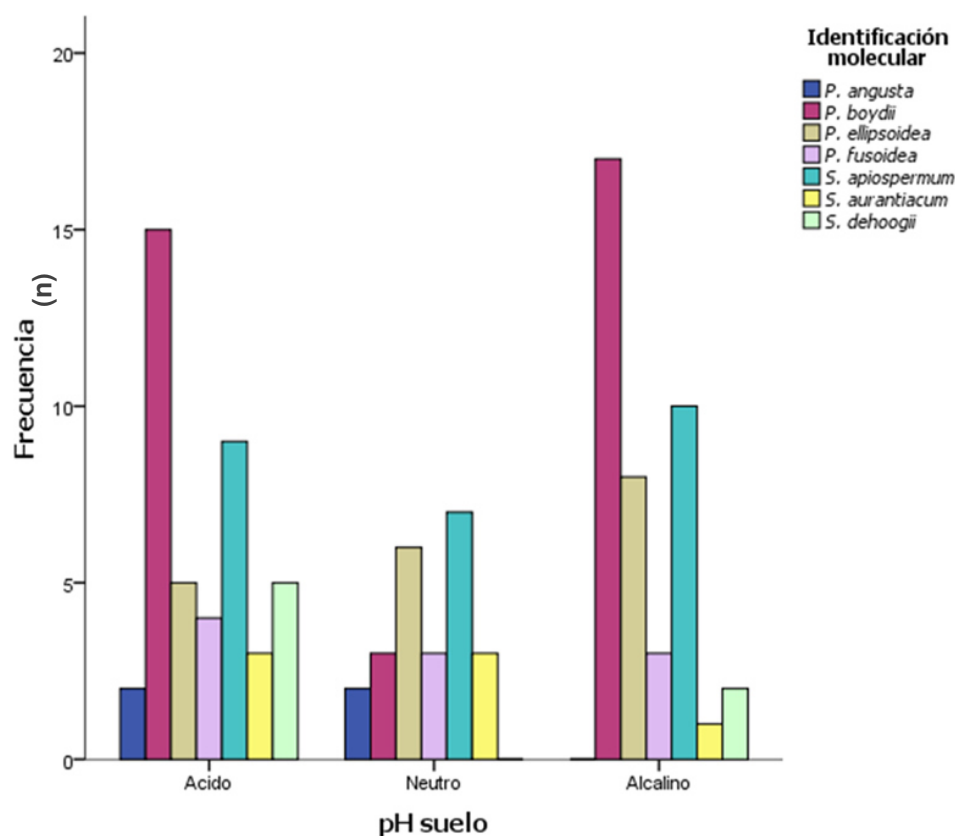


Figura 40. Correlación entre la identificación molecular y pH del suelo de los aislamientos de las especies del complejo identificadas en México.

La producción de actividad proteasa y fosfolipasa está relacionada con la virulencia de los microorganismos, es por esta razón que se realizó la comparación entre la producción de estas dos enzimas y la identificación molecular de las especies del complejo *Scedosporium*. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.233$). La mayoría de las especies fueron productoras de fosfolipasa y negativas para la producción de proteasa y otro grupos de cepas no fueron capaces de producir ambas enzimas (ver Figura 41).

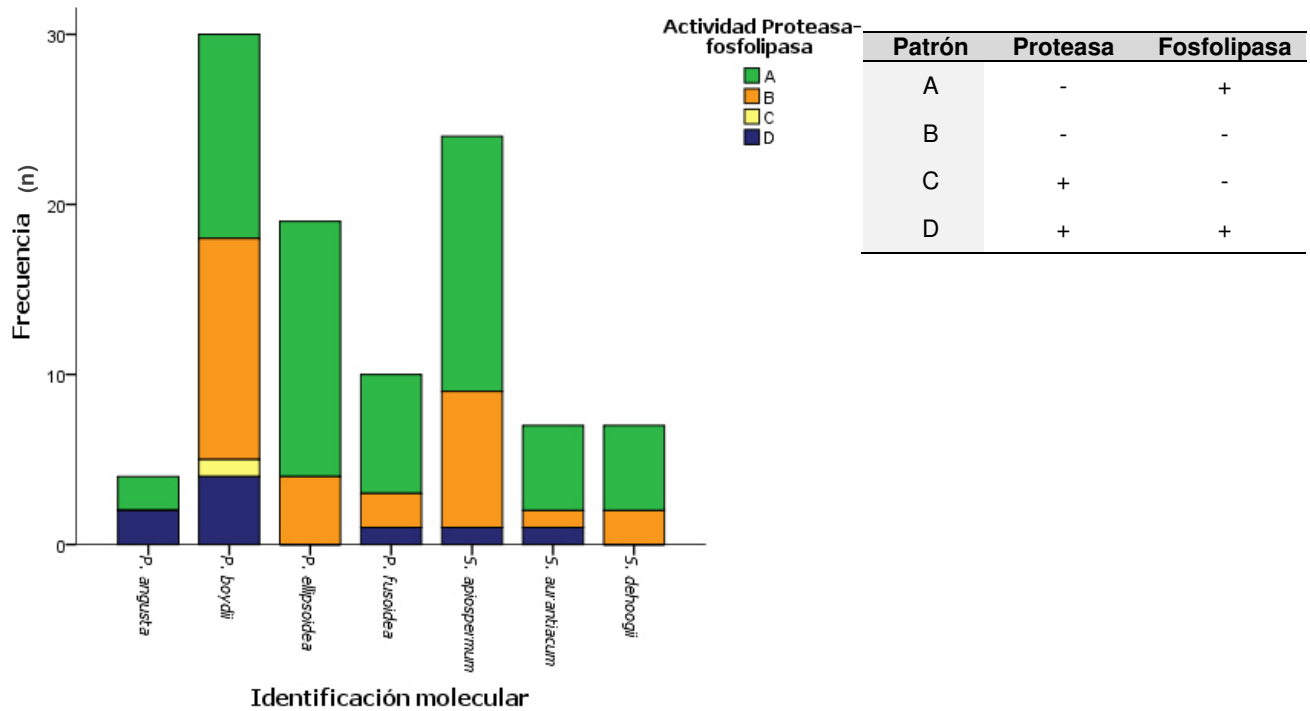


Figura 41. Correlación entre la identificación molecular y la actividad proteasa y fosfolipasa de los aislamientos de las especies del complejo identificadas en México.

En el caso de los aislamientos clínicos de *L. prolíficas* y las especies del complejo podemos ver que la mayoría de los aislamientos fueron de distintos orígenes clínicos y no hubo una tendencia que permitiera encontrar a estos hongos en un sitio específico. Sin embargo, la mayoría fueron aislados de pulmón o de sitios relacionados con una infección diseminada, por lo que no hubo diferencia significativa ($p > 0.107$) entre la identificación molecular con respecto al origen de aislamiento (ver Figura 42).

Por otra parte, al comprar la identificación molecular con la actividad proteasa y fosfolipasa en los aislamientos clínicos se pudo observar que el 100% de las cepas de *L. prolíficas* son productoras de fosfolipasa pero no de actividad proteasa, a diferencia de *S. boydii* y *S. apiospermum* que muestran una actividad variable es decir algunas de ellas presenta actividad proteasa y fosfolipasa y otras solo proteasa o fosfolipasa. Aunque se encontró una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los parámetros el número de cepas de cada una de las especies fue pequeña por lo que no permite establecer una diferencia estadísticamente confiable (ver Figura 43).

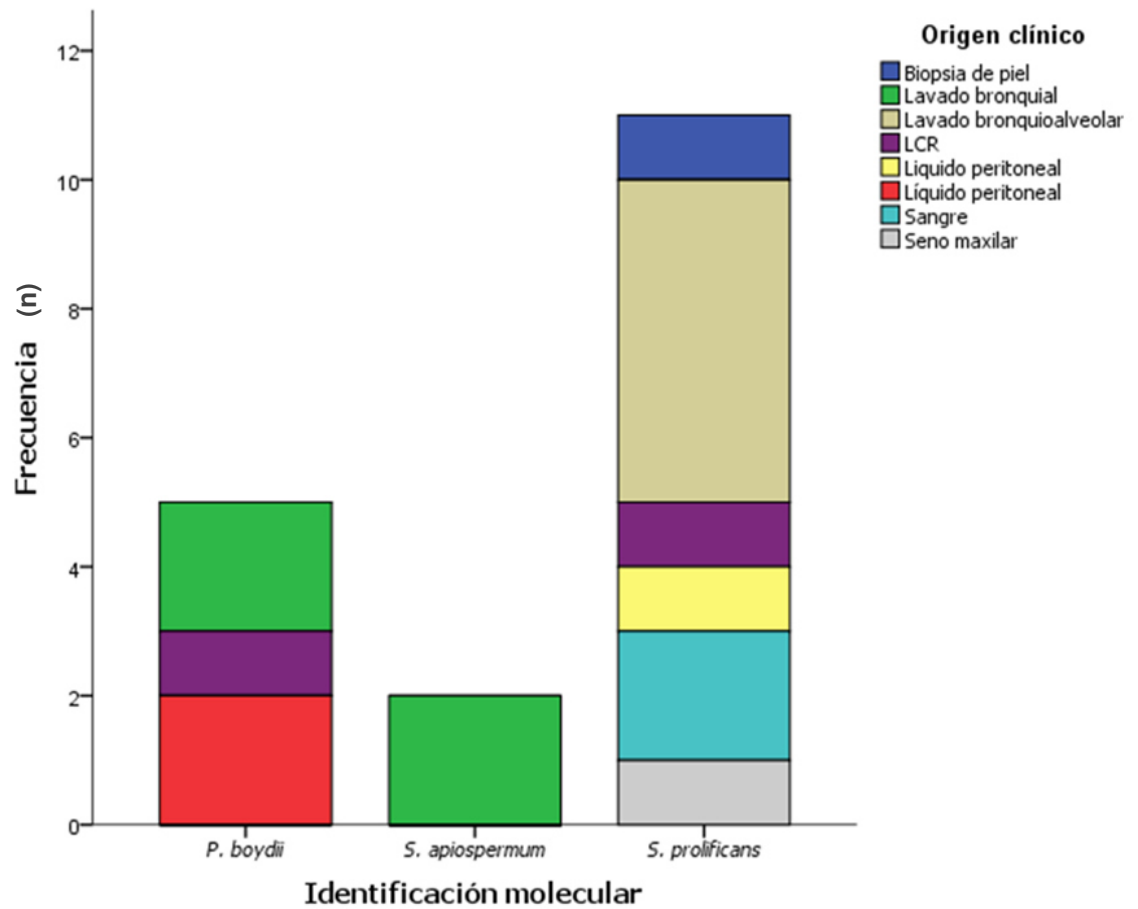


Figura 42. Correlación entre la identificación molecular y el origen de los aislamientos clínicos de *L. prolificans* y las especies del complejo identificadas en México.

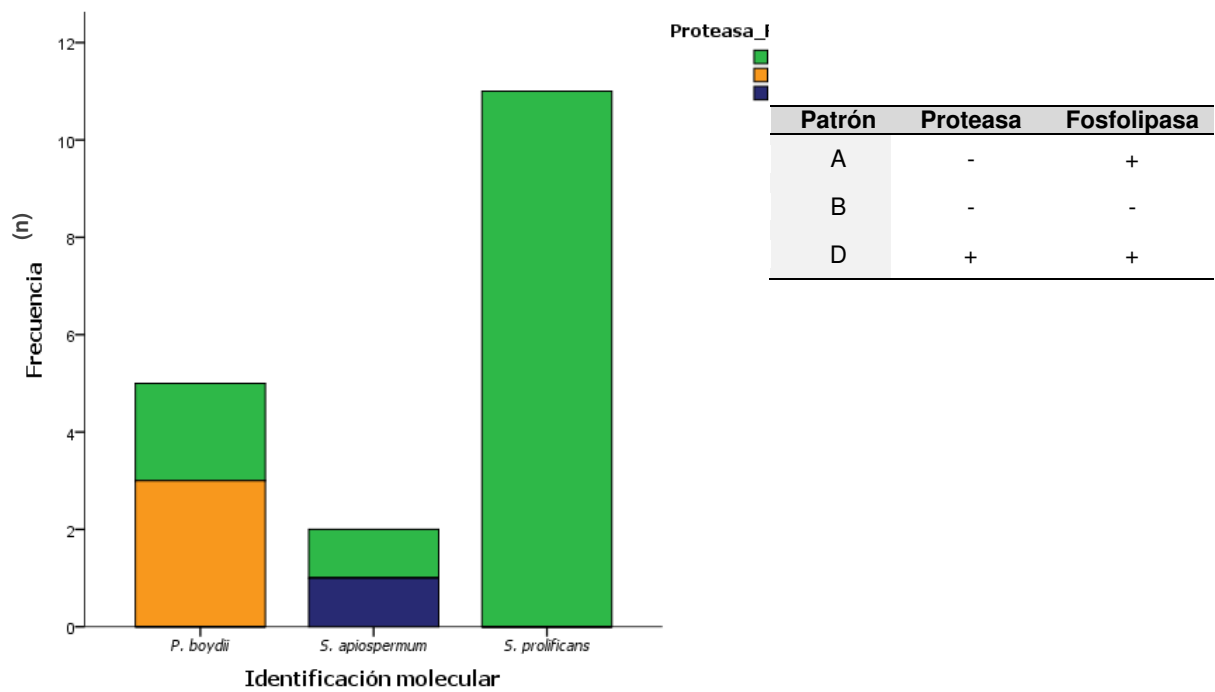


Figura 43. Correlación entre la identificación molecular y la actividad proteasa y fosfolipasa de los aislamientos clínicos de las especies del complejo identificadas en México.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

S. boydii fue la especie más frecuente del complejo *Scedosporium* y también la de mayor interés por su cada vez más elevada implicación en clínica, son capaces de causar infecciones de pronóstico grave, difíciles de resolver y con una elevada mortalidad (de Hoog y col., 2000). La importancia clínica de las especies del complejo y las dificultades que representan su diagnóstico derivado en gran medida por la alta variabilidad fenotípica.

En numerosos trabajos se ha demostrado que *S. boydii* no sólo presenta variabilidad fenotípica (de Hoog y col., 1994; Gilgado y col., 2005) sino también variabilidad genética entre las especies (Rainer y col., 2000; Williamson y col., 2001; Defontaine y col., 2002; Gilgado y col., 2005). Lo cual corroboramos con nuestros hallazgos ya que las 7 especies del complejo identificadas en nuestros estudios presentan una alta variabilidad fenotípica y lo que hace que no se pueda llegar a una identificación precisa de las especies por estos parámetros.

Aunque se sabe que la actividad enzimática de proteasa y fosfolipasa está asociada a virulencia en muchos hongos, no observamos una diferencia significativa ($p > 0.268$) en la producción de estas enzimas entre las diferentes especies, sin embargo; no se ha reportado la producción de éstas de forma

específica para cada especie del complejo, lo que significa una oportunidad de búsqueda.

Por otra parte, los estudios moleculares realizados por Gilgado y *col.*, en el 2005 concluyeron que *P. angusta*, *P. ellipsoidea*, *P. fusoides* y *S. boydii* eran especies genéticamente distintas y no deberían considerarse sinónimas de *S. boydii* de acuerdo a lo propuesto por Rainer y *col.*, 2002.

Por lo anterior el loci ITS que se eligió para la identificación molecular ya había sido utilizado por otros autores en estudios taxonómicos similares. La información que nos aportó la secuenciación parcial del gen de ITS del ARNr, fue limitada debido a la alta variabilidad intra-especie observada en la mayoría de las especies identificadas, sin embargo las especies de *S. aurantiacum* y *L. prolificans* mostraron una homología mayor al 99% lo que permitió una identificación precisa de estas especies. En México, se logró aislar 7 de las especies del complejo *Scedosporium* (*S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoides* y *P. ellipsoidea*) además de especies relacionadas como *L. prolificans*. Sin embargo; *S. minutisporum* no se logró aislar de las muestras de suelo colectadas y *S. dehoogii* tuvo una alta prevalencia en los lodos de las muestras de las plantas tratadoras de agua.

Existe una amplia variabilidad genética intra-especie (ITS), en los aislamientos encontrados en nuestro país, lo anterior crea una problemática debido a la estrecha relación filogenética entre las especies de *S. boydii*, *P. angusta*, *P. fusoides* y *P. ellipsoidea* (Gilgado y *col.*, 2008; Lackner y *col.*,

2012). Debido a esta problemática es necesario llevar a cabo la secuenciación de otras regiones parciales de genes conservados como β -tubulina, calmodulina o la región D1 y D2 del ARNr tal y como lo sugieren otros autores con la finalidad de poder dilucidar con precisión cada una de las especies.

Las especies del complejo *Scedosporium*, se aislaron de distintas áreas geográficas de México, donde existe una amplia variedad de climas y condiciones ambientales que han favorecido la amplia distribución de estas especies. La mayoría de las especies encontradas en México fueron aisladas de áreas con gran impacto humano como son: parques públicos, deportivos, industriales, sedimentos de arroyos, ríos, jardín de casa, etc., siendo el jardín urbano e industrial donde se aislaron con mayor frecuencia, lo que concuerda con lo reportado por Rougeron y col., (2014). Por otra parte, los parámetros de pH (4.3 -7.8) y nitrógeno total (0.10 - 0.8) del suelo de las muestras positivas, así como, la cantidad de aislamiento de las especies del complejo concuerdan con los resultados obtenidos por Kaltseis y col., (2009), donde establece una relación entre la concentración de nitrógeno del suelo y el aislamiento de las especies del complejo de *Scedosporium*.

L. prolificans, *S. apiospermum* y *S. boydii* fueron las especies más frecuentes en las muestras clínicas asociadas a patologías graves en este estudio. En un estudio realizado por Ortoneda y col., (2002), *L. prolificans*, especie cercana a *S. boydii*, en el cual utilizaron un modelo animal de infección sistémica por dicha especie, demostraron que no existen diferencias en la virulencia entre cepas ambientales y clínicas ni entre aquellas que habían

causado infección invasiva o que se habían comportado como meramente colonizadoras.

Las infecciones provocadas por *Scedosporium* spp., son de difícil tratamiento debido a la resistencia que presentan a la mayoría de los antifúngicos disponibles (Guarro y col., 2006). Pudimos demostrar que el VRC, antifúngico recomendado en el tratamiento de la scedosporiosis (Guarro y col., 2006; Pfaller y col., 2006 y Gilgado y col., 2006), fue el más activo *in vitro* en todas las especies ensayadas. El POS fue el segundo en actividad, una opción para las infecciones producidas por estas especies, el cual puede ser un tratamiento alternativo en aquellos casos en que la terapia con VRC falle.

Por otro lado, las equinocandinas mostraron una buena CME frente a la mayoría de los aislamientos clínicos y ambientales del complejo de *Scedosporium*, concordando con lo publicado por Lackner y col., (2012). *L. prolificans* mostró una alta resistencia a todos los antifúngicos probados, lo anterior es preocupante debido a la gravedad de las patologías que produce y al reto terapéutico para controlar la infección.

Mediante el estudio de infección sistémica en un modelo murino determinamos la virulencia entre algunas de las especies del complejo de “*Scedosporium*”. Numerosos estudios de virulencia en modelos animales habían demostrado diferencias en la virulencia entre especies próximas que pertenecían a un mismo género (Ortoneda y col., 2002; Gilgado y col., 2009, Rodríguez y col., 2010). Para ello se implementó un modelo murino de infección diseminada

en ratones inmunocompetentes determinando la carga microbiana en base a un ensayo piloto para determinar las condiciones de experimentación más adecuadas para nuestros propósitos. Estos modelos de infección fueron probados con 2 cepas de cada una de las siguientes especies: *S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*. Por otra parte se realizó otro modelo de infección sistémica probando tres cepas de *L. proliferans* determinando la supervivencia y carga microbiana en ratones inmunocompetentes.

Este estudio puso de manifiesto que *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* fueron las especies del complejo que presentaban una mayor virulencia en el modelo animal. Esta virulencia podía ser comparada con la de *L. proliferans*, más virulenta que *S. boydii* como había sido demostrado por Ortoneda y col., (2002); Gilgado y col., (2009).

Estos resultados demuestran la importancia de la correcta identificación de todas las especies del complejo. Hemos visto como *S. apiospermum* y *S. aurantiacum* han demostrado ser las especies más resistentes a los antifúngicos ensayados así como las más virulentas en un modelo animal, por lo que es muy importante la correcta identificación de esta especie en infecciones humanas. Por otra parte es importante señalar que los aislamientos de *L. proliferans* probados mataron del 60 – 100% de los ratones infectados lo que supone que estas especies son muy virulentas.

Aunque se buscó una correlación entre la identificación molecular y distintas características del suelo y características fenotípicas, no se logró establecer una relación específica entre las especies y dichos parámetros.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIÓN

1. Se llevó a cabo un estudio filogenético basado en el análisis de una región parcial del ITS del ADNr, lo que corroboró que el complejo de *Scedosporium* está compuesto por una variedad de especies crípticas.

2. La secuenciación de la región parcial del gen del ITS del ADN reportó información filogenética para la identificación de las especies del complejo, sin embargo; es necesaria la secuenciación de otros genes conservados como β -tubulina, región D1 y D2 del ADNr, calmodulina, etc., para corroborar esta identificación.

3. Se logró el aislamiento de 7 especies del complejo *Scedosporium* (*S. boydii*, *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *S. dehoogii*, *P. angusta*, *P. fusoidea* y *P. ellipsoidea*), así como también cepas de *L. prolificans* a partir de aislamientos clínicos.

4. Se logró el aislamiento de las especies del complejo a partir de distintos orígenes y áreas geográficas del país, destacando a *Scedosporium apiospermum* como la especie más ampliamente distribuida en México. El sitio donde se obtuvieron el mayor número de aislamientos fue de jardín urbano y parques industriales.

5. Mediante las determinaciones fisiológicas no fue posible llegar a una identificación precisa de las especies del complejo.

6. Se demostró que todas las especies del complejo obtenidas son muy resistentes *in vitro* a los antifúngicos convencionales. Los aislamientos de *L. prolificans* fueron los que mostraron mayor resistencia a todos los antifúngicos probados.

7. *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* y *L. prolificans* fueron las especies más virulentas en un modelo murino de infección sistémica sin inmunosupresión.

PERSPECTIVAS

- 1.- Secuenciación de otro gen (CAL, β -TUB, región D1 y D2 del ADNr) para un mejor análisis de las variantes.
- 2.- Llevar a cabo un muestreo de suelo más amplio a nivel nacional para establecer la distribución precisa de las especies.
- 3.- Llevar a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* del tipo de respuesta inmune que presentan cada una de las especies.
- 4.- Dilucidar el mecanismo por el cual se lleva a cabo el tropismo hacia el sistema nervioso central.

REFERENCIAS

1. **Negrón P**, Fisher I. 1944. *Pseudallescheria sheari* n. gen., n. sp., aislada de un micetoma de la rodilla. *Rev Inst Bacteriol.* 12:195-204.
2. **Von Arx JA**, Figueras MJ, Guarro J. 1988. *Sordariaceous ascomycetes* without ascospore ejaculation. *Beihefte Nova Hedwigia* 94:1-104.
3. **De Hoog GS**, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. 2000. Atlas of Clinical Fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht, The Netherlands; Reus, Spain.
4. **Castellani A**, Chalmers AJ. 1919. Manual of tropical medicine, 3rd ed. William, Wood and Co., New York.
5. **Shear CL**. 1922. Life history of described ascomycete isolated from a granular mycetoma of man. *Mycologia* 14:239-243.
6. **Dykstra MJ**, Salkin IF, McGinnis MR. 1989. An ultrastructural comparison of conidiogenesis in *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium inflatum* and *Scopulariopsis brumptii*. *Mycologia*. 81:896-904.
7. **Hironaga M**, Watanabe S. 1980. Annellated conidiogenous cells in *Petriellidium boydii* (*Scedosporium apiospermum*). *Sabouraudia* 18:261-268.
8. **Malloch D**. 1970. New concepts in the *Microascaceae* illustrated by two new species. *Mycologia*. 62:727-740.
9. **McGinnis MR**, Padhye AA, Ajello L. 1982. *Pseudallescheria negronii* Fischer, 1943 and its later synonym *Petriellidium malloch*, 1970. *Mycotaxon* 14: 97.

10. **Gilgado F**, Cano J, Gené J, Guarro J. 2010. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med Mycol.* 48: 122-128.
11. **Rainer J**, de Hoog GS, Wedde M, Gräser Y, Gilges S. 2000. Molecular variability of *Pseudallescheria boydi*, a neurotropic opportunist. *J Clin Microbiol.* 38:3267-3273.
12. **Gilgado F**, Cano J, Gené J, Guarro J. 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol.* 43:4930-4942.
13. **Gilgado F**, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. 2008. Molecular and phenotypic data supporting distinct species status for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol.* 46 (2):766-771.
14. **Castellani A**, Chalmers AJ. 1919. Manual of tropical medicine, 3rd ed. William, Wood and Co., New York.
15. **Emmons CW**. 1944. *Allescheria boydii* and *Monosporium apiospermum*. *Mycologia.* 36:188-193.
16. **Saccardo PA**. 1886. Sylloge Fungorum. 4: 611.
17. **Saccardo PA**, Sidow P. 1899. Sylloge Fungorum 14: 464.
18. **Saccardo PA**. 1911. Notae mycologicae [Mycological notes]. *Annls. Mycol.* 9:249-257.

19. **Okada G**, Seifert KA, Takematsu A, Yamaoka Y, Miyazaki S, Tubaki K. 1998. Amolecular phylogenetic reappraisal of the *Graphium* complex based on 18S rDNA sequences. *Can J Bot.* 76:1495-1506.
20. **Lackner M**, De Hoog GS, Yang L, Ferreira LM, *et al.* 2014. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity*.
21. **Cortez JK**, Roilides E, Quiroz-Tellez F, Meletiadiis J, *et al.* 2008. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev.* 21(1):157-197.
22. **Guého E**, de Hoog GS. 1991. Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J Mycol Med.* 118:3-9.
23. **De Hoog GS**, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E. 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses.* 37:71-78.
24. **Santos A**, Bittencourt V, Pinto MR, Silva B. 2009. Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Med Mycol.* 47:375-386.
25. **Rainer J**, Rambach G, Kaltseis J, Hegleitner M, Heiss S, Spech C. 2011. Phylogeny and immune evasion: a putative correlation for cerebral *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. *Mycoses.* 53(3):48-55.
26. **Figueiredo RT**, Bittencourt VCB, Lopes LCL, Sassaki G, Barreto-Bergter E. 2012. Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. *Carbohydr Res.* 356:260-264.

27. **Williamson ECM**, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJJ. 2001. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol.* 39:47-50.
28. **Defontaine A**, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, *et al.* 2002. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 40:2108-2114.
29. **Geiser DM**, Pitt JI, Taylor JW. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin- producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proc Natl Acad Sci.* 95:388–393.
30. **Gerrits van den Ende AHG**, de Hoog GS. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. *Stud Mycol.* 43:151-162.
31. **Zalar P**, De Hoog GS, Gunde-Cimerman N. 1999. Ecology of halotolerant dothideaceous black yeasts. *Stud Mycol.* 43:38-48.
32. **Guarro J**, Gené J, Stchigel AM. 1999. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 12:454-500.
33. **Viaud M**, Pasquier A, Brygoo Y. 2000. Diversity of soil fungi studied by PCR-RFLP of ITS. *Mycol Res.* 9:1027-1032.
34. **Gené J**, Guillamón JM, Guarro J, Pujol I, Ulfing K. 1996. *Hormographiella aspergillata* anamorph of *Coprinus cinereus*, a human opportunistic fungus: molecular characterization and antifungal susceptibility. *Anton Leeuw Int J G.* 70:49-57.

35. **Jackson JC**, Barton RC, Evans EGV. 1999. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J Clin Microbiol.* 37:931-936.
36. **Blanz P**, Buzina W, Ginter G, Gräser Y. 2000. Molecular biological methods and their consequences in taxonomy and diagnosis of dermatophytes. *Mycoses.* 43:suppl.1:11-19.
37. **Quirk JT**, Kupinsky JM. 2002. Interespecific mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphisms in *Aspergillus* section Flavi. *Mycologia.* 94:1078-1086.
38. **Welsh J**, McClland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
39. **Kano R**, Nakamura Y, Watanabe S, Takahashi H, Tsujimoto H, Hasegawa A. 1998. Differentiation of *Microsporum* species by random amplification of polymorphic DNA(RAPD) and Southern hybridization analyses. *Mycoses* 41:229-233.
40. **Boldo XM**, Villa-Tanaca L, Zúñiga G, Hernández-Rodríguez C. 2003. Genetic diversity among clinical isolates of *Candida glabrata* analyzed by randomly amplified polymorphic DNA and Multilocus enzyme electrophoresis Analyses. *J Clin Microbiol.* 41:4799-4804.
41. **Taylor JW**, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, *et al.* 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 31:21-32.

42. **Majer D**, Mithen R, Lewis BG, Vos P, Oliver RP. 1996. The use of AFLP fingerprinting for the detection of genetic variation in fungi. *Mycol Res.* 100:1107-1111.
43. **Treadway LP**, White JF Jr, Gaut BS, Reddy PV, Richardson MD, Clarke BB. 1999. Phylogenetic relationships within and between *Epichloë* and *Neotyphodium endophytes* as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. *Mycol. Res.* 103:1593-1603.
44. **Schmidt H**, Niessen L, Vogel RF. 2004. AFLP analysis of *Fusarium* species in the section *Sporotrichiella*-evidence for *Fusarium langsethiae* as a new species. *Int J Food Microbiol.* 95:297-304.
45. **Soll DR**. 2000. The ins and outs of DNA fingerprinting the infectious fungi. *Clin Microbiol Rev.* 13:332-370.
46. **Gräser Y**, Kühnisch J, Presber W. 1999. Molecular markers reveal exclusively on all reproduction in *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol.* 37:3713-3717.
47. **Kirk PM**, Cannon PF, David JC, Stalpers JA. 2001. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 9th ed. CAB International, Wallingford.
48. **Rainer J**, De Hoog GS. 2006. Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (*Microascaceae*) containing opportunistic agents on humans. *Mycol Res.* 110:151-160.
49. **Zeng JS**, Fukushima K, Takizawa K, Zheng YC, Nishimura K, Gräser Y, *et al.* 2007. Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol.* 45: 547-558.

50. **Qiaoyun Lu**, Gerrits VDE, Bakkers JMJE, Jiufeng Sun, Lackner M, Najafzadeh MJ, *et. al.* 2011. Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. *J Clin Microbio.* 49 (3):960-967.
51. **Lackner M**, Klaassen CH, Meis JF, Gerrits VDE, De Hoog GS. 2011. Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. *Med Mycol.* 1-12.
52. **Steinmann J**, Schmidt D, Buer J, Rath PM. 2011. Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semi automated repetitive sequence-based PCR. *Med Mycol.* 49:475-483.
53. **Lackner M**, Najafzadeh MJ, Sun J, Qiaoyun Lu, De Hoog GS. 2012. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. *Appl Environ Microbiol.* 78(1):126-33.
54. **Whelan S**, Liò P, Goldman N. 2001. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. *Trends Genet.* 17:262-272.
55. **Vandamme AM**. 2003. Basic concepts of molecular evolution. Pp. 1-23. En: The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny (Salemi M and Vandamme AM, eds.). Cambridge University Press. Cambridge. England.
56. **Maley LE**, Marshall CR. 1998. The coming of age of molecular systematics. *Science.* 279:505-506.

57. **Nikoh N**, Hayase N, Iwabe N, Kuma K, Miyata T. 1994. Phylogenetic relationships of the kingdoms *Animalia*, *Plantae* and *Fungi*, inferred from 23 different protein species. *Mol Biol Evol.* 11:762-768.
58. **Nixon KC**, Carpenter JM. 1994. On outgroups. *Cladistics.* 9: 413-426.
59. **Wheeler WC**. 1990. Nucleic acid sequence phylogeny and random outgroups. *Cladistics.* 6: 363-368.
60. **Saitou N**, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.
61. **Farris JS**, Albert VA, Källersjö M, Lipscomb D, Kluge AG. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.
62. **Carpenter JM**. 1992. Random cladistics. *Cladistics* 8:174-153.
63. **Farris JS**. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. Pp. 277-302. En: Advances in Cladistics (Platnick NI and Funk VA, eds.), Columbia University Press. New York.
64. **Felsenstein J**. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst Zool.* 27: 401-410.
65. **Huelsenbeck JP**. 1997. Is the Felsenstein zone a fly trap?. *Syst Biol.* 46:69-74.
66. **Huelsenbeck JP**, Crandall KA. 1997. Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annu Rev Ecol Syst.* 28:437-466.
67. **Swofford DL**, Olsen GJ, Waddell PJ, Hillis DM. 1996. Phylogenetic Inference. Pp. 407- 514. En: Molecular systematics (Hillis DM, Moritz C, Mable BK, eds.). Sinauer Associates, Sunderland.

68. **Huelsenbeck JP**, Ronquist R, Nielsen R, Bollback JP. 2001. Bayesian Inference of Phylogeny and Its Impact on Evolutionary Biology. *Science*. 294:2310-2314.
69. **Huelsenbeck JP**, Bollback JP. 2001. En: Handbook of Statistical genetics (Bishop M, ed.), Wiley. London.
70. **Felsenstein J**. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
71. **Hillis DM**, Dixon MT. 1991. Ribosomal DNA — molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol*. 66:410-453.
72. **Bruns TD**, White TJ, Taylor JW. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annu Rev Ecol Syst*. 22:525-564.
73. **Bruns TD**, Vilgalys R, Barns SM, Gonzalez D, Hibbett DS, Lane DJ, et al. 1992. Evolutionary relationships within the Fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*. 1:231-241.
74. **Butler DK**, Metzenberg RL. 1989. Premeiotic change of nucleolus organizer site in *Neurospora*. *Genetics*. 122:783-791.
75. **Iwen PC**, Hinrichs SH, Rupp ME. 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol*. 40:87-109.
76. **Einsele H**, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Muller CA, et al. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol*. 35:1353-1360.

77. **White TJ**, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: PCR protocols: a guide to the methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ eds.), Academic Press. New York. USA.
78. **Sampaio JP**, Weiß M, Gadanho M, Bauer R. 2002. New taxa in the *Tremellales*: *Bulleribasidium oberjochense* gen. et sp. nov., *Papiliotrema bandonii* gen. et sp. nov. and *Fibulobasidium murrhardtense* sp. nov. *Mycologia*. 94:873–887.
79. **Gonzalez IL**, Chambers C, Gorski JL, Stambolian D, Schmickel RD, Sylvester JE. 1990. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *J Mol Biol*. 212:27-35.
80. **Joseph N**, Krauskopf E, Vera MI, Michot B. 1999. Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Res*. 27:4533-4540.
81. **Berbee ML**, Taylor JW. 2001. Fungal Molecular Evolution: Gene Trees and Geologic Time. Pp. 229-245. En: The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research (McLaughlin DJ, McLaughlin E, eds.), Volume VII, Springer. New York.
82. **Jong SN**, Lévesque CA, Verkley GJM, Abeln ECA, Rahe JE, Braun PG. 2001. Phylogenetic relationships among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA, and the β -tubulin gene. *Mycol Res*. 105:658-669.

83. **O'Donnell K**, Cigelnik E, Nirenberg, HI. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90:465-493.
84. **Couch BC**, Kohn LM. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*. 94:683-693.
85. **Cruse M**, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW. 2002. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia*. 94:814–822.
86. **James P**, Vorherr T, Carafoli E. 1995. Calmodulin-binding domains: just two-faced or multifaceted. *Trends Biochem Sci*. 20:38-42.
87. **Rasmussen CD**, Means RL, Lu KP, May GS, Means AR. 1990. Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*. 265:13767-13775.
88. **O'Donnell K**, Nirenberg HI, Aoki T, Cigelnik E. 2000c. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*. 41:61-78.
89. **Castiglioni B**, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S. 2002. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*) infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine*. 81:333-348.
90. **Steinbach WJ**, Perfect JR. 2003. *Scedosporium* species infections and treatments. *J Chemother*. 15:16–27.

91. **Cimon B**, Carrere J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. 2000. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19:53-56.
92. **Heath CH**, Slavin MA, Sorrell TC, Handke R, Harun A, Phillips M, *et al*. 2009. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect*. 15(7):689-93.
93. **Rodriguez-Tudela JL**, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, de Hoog GS, *et al*. 2009. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med Mycol*. 47(4):359-70.
94. **Lackner M**, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH. 2011. Infection and colonization due to *Scedosporium* in Northern Spain. An *in vitro* antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses*. 54 Suppl 3:12-21.
95. **Espinel-Ingroff A**. 1994. La estandarización de las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos y métodos alternativos. *Rev Esp Quimioter*. 7:20-31.
96. **Carrillo AJ**, Guarro J. 2001. *In vitro* activities of four novel triazoles against *Scedosporium* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 45:2151-2153.
97. **Cuenca-Estrella M**, Ruiz-Diez B, Martinez-Suarez JV, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. 1999. Comparative *in vitro* activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. *J Antimicrob Chemother*. 43:149–51.

98. **Meletiadiis J**, Meis JF, Mouton JW, Rodriquez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE. 2002. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:62-68.
99. **González GM**, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG, Loebenberg D. 2005. *In vitro* activities of new and established triazoles against opportunistic filamentous and dimorphic fungi. *Med Mycol.* 43(3):281-4.
100. **Gilgado F**, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(12):4211-3.
101. **Lackner M**, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, *et al.* 2012. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 56(5):2635-42.
102. **Guarro J**, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, *et al.* 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol.* 44(4):295-327.
103. **Pastor EJ**, Guarro J. 2007. El papel del voriconazol en el tratamiento de las micosis emergentes. *Rev Iberoam Micol.* 24: 228 – 232.
104. **González GM**, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Rinaldi MG, Loebenberg D, *et al.* 2003. Activity of posaconazole against *Pseudallescheria boydii*: *in vitro* and *in vivo* assays. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:1436-1438.

105. **Mellinghoff IK**, Winston DJ, Mukwaya G, Schiller GJ. 2002. Treatment of *Scedosporium apiospermum* brain abscesses with posaconazole. *Clin Infect Dis.* 34:1648-50.
106. **González GM**, Tijerina R, Najvar L, Rinaldi M, Yeh IT, Graybill JR. 2002. Experimental murine model of disseminated *Pseudallescheria* infection. *Med Mycol.*40(3):243-8.
107. **Ortoneda M**, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. 2002. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strains from different origins in a murine model. *J Med Microbiol.* 51(11):924-8.
108. **Gilgado F**, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J.2009. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol.* 47(4):371-4.
109. **Harun A**, Serena C, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. 2010. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *S. prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med Mycol.* 48 Suppl 1:S45-51.
110. **Rodríguez MM**, Calvo E, Serena C, Mariné M, Pastor FJ, Guarro J. 2009. Effects of double and triple combinations of antifungal drugs in a murine model of disseminated infection by *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 53(5):2153-5.
111. **Rodríguez MM**, Pastor FJ, Salas V, Calvo E, Mayayo E, Guarro J. 2010. Experimental murine scedosporiosis: histopathology and azole treatment. *Antimicrob Agents Chemother.*54(9):3980-4.

112. **Yarrow D.** 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Pp. 95-97. En: The yeasts, a taxonomic study, 4th ed. (Kurtzman CP and Fell JW ed.). Elsevier. Amsterdam. The Netherlands.
113. **Treviño-Rangel Rde J,** González JG, González GM. 2013. Aspartyl proteinase, phospholipase, esterase and hemolysin activities of clinical isolates of the *Candida parapsilosis* species complex. *Med Mycol*.51(3):331-5.
114. **Clinical Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution *antifungal* susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standards; 2nd Ed; Document M38A-2 National Committee for Laboratory Standards. Wayne, PA.
115. **Milne I,** Lindner D, Bayer M, Husmeier D, McGuire G, Marshall DF, et al. 2009. TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics*. 25:126–127.
116. **Drummond AJ,** Rambaut A, 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*.7:214.
117. **Gilgado** Barbadilla F. Tesis: Caracterización molecular y fenotípica del género *Pseudallescheria* y géneros afines. Universitat Rovira I Virgiliisbn, 978-84-691-1010-2/DL: T.2218-2007.

APENDICE A

MEDIOS DE CULTIVO

Agar de Sabouraud. Difco®

| | |
|----------------|---------|
| Peptona | 10 g |
| Glucosa | 20 g |
| Agar | 15 g |
| Cloranfenicol | 500g |
| Agua destilada | 1000 mL |

Agar papa dextrosa. Bioxon®

| | |
|----------------|---------|
| Papa | 200g |
| Glucosa | 20g |
| Agar | 20g |
| Agua destilada | 1000 ml |

Agar nitrógeno base (solución concentrada)

| | |
|-------------------------|--------|
| Nitrógeno base | 6.5 g |
| Sustrato (carbohidrato) | 5 g |
| Agua destilada | 100 mL |

NOTA: 0.5 mL concentrado + 4.5 mL agua destilada estéril.

Agar gelatina

| | |
|----------------|---------|
| Gelatina | 100 g |
| Glucosa | 5 g |
| Nitrógeno base | 6.7 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

Agar BSA

| | |
|--------------------------------|--------|
| Carbón base | 11.7 g |
| Extracto de levadura | 0.01 g |
| Albúmina de suero bovino (BSA) | 0.2 g |
| Agar-agar 3% | 5.6 g |
| Agua destilada | 500 mL |

NOTA: Ajustar el pH a 5.0.

Agar yema de huevo

| | |
|---------------------------|---------|
| Agar Sabouraud | 34 g |
| Glucosa 3% | 30 g |
| NaCl 1 M | 58.44 g |
| CaCl ₂ 0.005 M | 0.55 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

NOTA: esterilizar en autoclave

| | |
|---------------------|-------|
| Egg Yolk 50% Bacto™ | 80 mL |
|---------------------|-------|

NOTA: Agregar la yema de huevo a una temperatura $\leq 50^{\circ}\text{C}$, homogenizar y vaciar.

APÉNDICE B

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Bromuro de etidio 0.5 mg/mL (solución stock)

Disolver 25 mg de bromuro de etidio en 40 mL de agua ultrapura. Aforar a 50 ml y almacenar a 4°C protegido de la luz en un recipiente de vidrio ámbar.

Bromuro de etidio 2 µL/mL (solución de trabajo)

Preparar una dilución 1:250 de la solución stock para teñir los geles de agarosa (1 mL de la solución stock más 249 mL de agua ultrapura).

EDTA 500 mM pH 8.0 (ácido etilen diamino tetracético).

Disolver 9.306 g de Na₂EDTA.2H₂O en 40 mL de agua ultrapura, ajustar el pH a 8.0 con lentejas de NaOH y aforar a 50 mL.

Etanol al 70%

Mezclar 70 mL de etanol al 100% más 30 mL de H₂O destilada estéril.

Fenol saturado

1. Destilación: Se funde el fenol a 68°C. Se procede a destilarlo si su aspecto al estar fundido no es cristalino (el fenol destila a una temperatura de 180°C, es recomendable no conectar agua circulante porque el fenol puede cristalizarse en el

mismo refrigerante). El fenol que va destilando se puede recibir en un pequeño volumen de Tris- HCl 0.5 M para evitar su cristalización.

2. Saturación: Antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 debido a que el DNA puede quedar dentro de la fase orgánica si el pH del fenol es ácido.

3. Agregar hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (función antioxidante).

4. Añadir un volumen de solución amortiguadora Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0 y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 (medir con papel indicador).

5. Agitar durante 48 h a temperatura de refrigeración, dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o embudo de separación.

6. Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0.

7. Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volúmenes de Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 conteniendo β -mercaptoetanol a una concentración 0.2%.

8. La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un frasco oscuro a -20°C, las alícuotas de fenol en uso se almacenan a 4°C.

Gel de agarosa al 2%

Disolver 2 g de agarosa por cada 100 mL de TBE 0.5X, calentar en microondas o en plancha de calentamiento hasta que esté fundido, agregar 10 μ L de bromuro de etidio 2 mg/ μ L por cada 100 mL de solución y vaciar en la cámara de electroforesis.

Gel de agarosa al 1.5%

Disolver 1.5 g de agarosa por cada 100 mL de TBE 0.5X, calentar en microondas o en plancha de calentamiento hasta que esté fundido, agregar 10 μ L de bromuro de etidio 2 mg/ μ L por cada 100 mL de solución y vaciar en la cámara de electroforesis.

Jugo azul 6X (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%)

Disolver 25 mg de azul de bromofenol, 25 mg de xilencianol y 3.0 mL de glicerol en TE 1X pH 8.0 aforar a 10 mL.

SEVAG (24:1)

Disolver 24 mL de cloroformo más 1 mL de alcohol isoamílico.

Proteinasa K 10 mg / mL

Disolver 100 mg de Proteinasa K en 10 mL de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5

SDS al 10% (Dodecil sulfato de sodio)

Disolver poco a poco 5 g de SDS en 50 mL de agua destilada.

SDS al 1% (Dodecil sulfato de sodio)

Mezclar 5 mL de una solución de SDS al 10% en 50 mL de agua destilada.

TBE 10X (Solución stock)

Disolver 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico en 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0 y en agua ultrapura aforar a 500 mL.

TBE 0.5X (Solución de trabajo)

Disolver 50 mL de TBE 10X en 400 mL de agua ultra pura y aforar a 1000 mL.

TE 1X

Mezclar 500 mL de Tris- HCl 500 mM, pH 8.0 y 50 mL de EDTA 500 mM en agua destilada, ajustar el pH a 8.0 y aforar a 25 mL.

TE 1X con SDS al 1%

Disolver 1 g de SDS en 100 mL de TE 1X.

Tris-HCl 500 mM, pH 8 (Solución stock)

Disolver 30.3 g de TRIS base en 300 mL de agua ultrapura, ajustar el pH con HCl concentrado y aforar a 500 mL.

Acetato de sodio 3M pH 5

Disolver 12.3 g de acetato de sodio en 25 mL de agua destilada. Ajustar el pH con ácido acético glacial y aforar a 50 mL. Esterilizar en autoclave.